Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. K. Greeff

PRÄPARATION UND CHARAKTERISIERUNG EINER ENERGIEABHÄNGIGEN Ca^{2+} PUMPE IN VESIKELN DES SARKOLEMMAS AUS KANINCHENHERZEN PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DES Ca^{2+} TRANSPORTES.

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Siegbert Srugies

1983

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DER
MEDIZINISCHEN FAKULTAET DER
UNIVERSITAET DUESSELDORF.
DER DEKAN DER MEDIZINISCHEN FAKULTAET
DER UNIVERSITAET DUESSELDORF:
GEZ.: PROF.DR. HOPF
REFERENT: GEZ.: PROF.DR. NOACK
KORREFERENT: GEZ.: PROF.DR. KAUFMANN

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. K. Greeff

PRÄPARATION UND CHARAKTERISIERUNG EINER ENERGIEABHÄNGIGEN Ca^{2+} PUMPE IN VESIKELN DES SARKOLEMMAS AUS KANINCHENHERZEN. PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DES Ca^{2+} TRANSPORTES.

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Siegbert Grugies

1983

INHALTSVERZEICHNIS

		SEITE
	0. Abkürzungen	5
	1. Einleitung	6
1.1	Theoretische Grundlagen	6
1.2	Gründe für die Arbeit	9
1.3	Erwartungen und Ziele	10
	2. Methodischer Teil	12
2.1	Präparation nach Levitsky et al.	12
2.1.1	Homogenisation des Gewebes	12
2.1.2	Differential- und Dichtegradienten-zentrifugation	12
2.1.3	Versuch der Trennung von Sarkolemma und Sarkoplasmatischem Retikulum durch Ca^{2+}-Beladung des SR	12
2.2	Präparation nach Schapira et al.	14
2.2.1	Homogenisation des Gewebes	16
2.2.2	Differential- und Dichtegradienten-zentrifugation	16
2.2.3	Trennung der Zonen mittels Fraktionator	17
2.3.	Präparation nach St. Louis und Sulakhe	17
2.3.1	Homogenisation des Gewebes	17
2.3.2	Differential- und Dichtegradienten-zentrifugation	18
2.3.3	Fraktionierung der Zonen	22

SEITE

3. Experimenteller Teil 22

3.1 Proteinbestimmung,Stabilität der Farbreaktion 22

3.2 Enzymbestimmung,Ouabain-Bindung, mitochondriale Atmung,Michaelis-Menten-Kinetik 23

3.3 Ca^{2+}-Aufnahme 31

3.4 Elektronenmikroskopie und Ergebnisse 31

3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Molekulargewichtsbestimmung und Ergebnisse 33

3.6 Michaelis-Menten-Kinetik 38

3.7 Affinitätschromatographie 38

3.8 Verwendete Substanzen 41

3.9 Statistische Methoden 42

4. Ergebnisse 43

4.1 Methodischer Teil 43

4.1.1 Vergleich der einzelnen Präparationen 43

4.1.2 Auswahl der Präparation nach St. Louis und Sulakhe 44

4.2 Experimenteller Teil 45

4.2.1 Charakterisierende allgemeine Daten: Proteinausbeute,Haltbarkeit des Transportproteins,Säulenchromatographie und Ausbeute an "Inside-out" und "Right-side-out" Vesikeln 45

4.2.2 Enzymaktivitäten,Ouabain-Bindungsstudie, Michaelis-Menten-Kinetik 47

4.2.3 Biochemie des Ca^{2+}-Aufnahmeprozesses, pharmakologische Beeinflussung des aktiven Transportprozesses 53

5. Diskussion 60

5.1 Beurteilung der Reinheit des isolierten Sarkolemmas (Mikroskopie, Enzyme, Elektrophorese, Ouabain-Bindung)

5.2 Vergleich mit Präparationen anderer Autoren

5.3 Charakterisierung der isolierten Vesikel: gemischt, "Inside-out", "Right-side-out"

5.4 Nützlichkeit der Trennung durch Affinitätschromatographie

5.5 Theorie des aktiven Transportes und Hinweis auf passive Ca^{2+}-Aufnahme

5.6 Gründe für die Verwendung von Oxalat für die Ca^{2+}-Aufnahmeversuche

5.7 Schlußfolgerungen aus den pharmakologischen Untersuchungen

6. Zusammenfassung 67

7. Literaturverzeichnis 69

8. Dank an den Referenten 78

9. Lebenslauf 79

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0059

0. Abkürzungen:

ANSA	Aminonaphtolsulfonsäure
ATP	Adenosin-5'-diphosphat
c-AMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
c-GMP	Guanosin-3',5'-monophosphat
Ca^{2+}-ATPase	Ca^{2+}-aktivierte Adenosin-triphosphatase
Ci	Curie
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Bis-(aminoäthyl)-glycoläther-N,N,N,N-tetraessigsäure
$NADPH_2$	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Na^+,K^+-ATPase	Na^+,K^+-aktivierte Adenosin-triphosphatase
SDS	Sodium dodecyl-sulfat Na-Dod-SO_4
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SL	Sarkolemma
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-D Puffer	Tris und DTT enthaltender Puffer

1. Einleitung

1.1 Theoretische Grundlagen

In den vergangenen Jahren ist von vielen Autoren berichtet worden, daß die Kontraktilität des Herzens durch Hormone und einige Pharmaka beeinflußt wird. Man stellt sich vor, daß diese Substanzen ihre Wirkung über eine Beeinflussung spezifischer Rezeptoren der Plasmamembran oder aber über eine Beeinflussung von plasmalemmalen Ionenströmen entfalten.
Dabei haben in letzter Zeit insbesondere die Ca^{2+}-ATPase, eine ATP-getriebene Ca^{2+}-Pumpe (6,22,27,30,31, 37,38), der elektrogene $Ca^{2+}Na^{+}$-Carrier (24), das Ca^{2+}-Calmodulin (12,21,30,47) und die Na^{+},K^{+}-ATPase (1,3,9, 10,13,14,41,42) die Aufmerksamkeit der experimentellen Forscher auf sich gezogen (s. Abb. 1).
Für den myokardialen Transport von Ca^{2+}-ionen sind ATP-hydrolisierende Transportsysteme beschrieben worden (2,11). Dabei zeigte es sich, daß nicht nur das SR, sondern auch das Plasmalemma über eine energieabhängige Ca^{2+}-Pumpe und eine Ca^{2+}-aktivierbare ATPase verfügt (Noack und Heinen, 1978 (35), Heinen und Noack, 1972 (8), Noack et al., 1977 (32,33,34), sowie (6,21,39, 41,46,50).
Die dem Ca^{2+}-Transport am Sarkoplasmatischen Retikulum zugrundeliegenden Teilprozesse sind weitgehend aufgeklärt (15,20). Das gleiche gilt für seine Rolle im

Rahmen der elektromechanischen Kopplung.

Neben der mit hoher Aktivität und Effektivität arbeitenden Ca^{2+}-ATPase des SR konnte von mehreren Autoren eine mit niedrigerer Aktivität arbeitende Ca^{2+}-ATPase im SL nachgewiesen werden (16,41,47,50).

Während die Ca^{2+}-ATPase und die Ca^{2+}-Pumpe des SR die physiologische Aufgabe haben, das währendder Systole freigesetzte Ca^{2+} wieder in seine intrazellulären Speicher zurückzupumpen, befördert die Ca^{2+}-Pumpe des SL das überschüssige, während der Plateauphase des Aktionspotentials aus dem Extrazellulärraum in die Zelle eingeströmte Ca^{2+} aus der Zelle heraus und sorgt so zusätzlich für eine Homöostase der Ca^{2+}-Konzentration in der Zelle (49). Beide Ca^{2+}-ATPasen können in ihrer Aktivität gesteigert werden, wenn ihr Aktivatorprotein, das Ca^{2+}-Calmodulin, gleichzeitig anwesend ist (21,47). Das Calmodulin, das mit dem Ca^{2+} reversible Komplexe bildet, stellt nicht nur eine besondere Speicherform des intrazellulären Calciums dar, sondern ist darüberhinaus auch in seiner aktivierten Form (wenn alle vier Bindungsstellen mit Ca^{2+} besetzt sind) an der Regulation zahlreicher anderer Enzyme beteiligt, nämlich der

Adenyl-Cyclase
Phosphodiesterase
Proteinkinase
Phospholipase A_2
sowie der Ca^{2+}-ATPase

Es besitzt demnach in der Zelle wie das c-AMP und das c-GMP die Funktion eines second messengers.
Das Ca^{2+}-Calmodulin spielt in der Zelle mit anderen Worten die Rolle eines Regulator-Enzyms.Die intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase (s. Abb. 1) läßt sich also nur durch eine intakte Funktion der Ca^{2+}-ATPasen sicherstellen.
Besonders wichtig könnte in diesem Zusammenhang die Ca^{2+}-ATPase des Plasmalemmas sein.Ihre Bedeutung ergibt sich daraus,daß die Herzzelle im Gegensatz zum quergestreiften Skelettmuskel zur Kontraktion auf extrazelluläres Ca^{2+} angewiesen ist.Dieses muß nach Ablauf des Aktionspotentials von der Membran-ATPase rasch wieder aus der Zelle in den Extrazellulärraum befördert werden,damit sich die Zelle in der Diastole relaxieren kann.

1.2 Gründe für die Arbeit

Bei der Untersuchung der myokardialen Ouabain-Wirkung beobachtete man in Gegenwart toxischer Konzentrationen nicht nur eine konzentrationsabhängige Hemmung der Na^+,K^+-aktivierbaren Membran-ATPase,sondern auch einen intrazellulären Anstieg des Gesamt-Ca^{2+}-gehaltes auf Grund einer erhöhten Ca^{2+}-Anreicherung.Dabei erhöht sich der intrazelluläre Calciumgehalt erst nach Einsetzen der negativ inotropen Wirkung,wobei der Ca^{2+}-Influx ungestört fortbesteht,während der Ca^{2+}-Efflux

ganz zum Erliegen kommt (Heinen und Noack, 1972, 8). Das weist darauf hin,daß Glykoside zumindest im toxischen Dosisbereich den aktiven Ca^{2+}-Auswärtstransport beeinflussen,wobei bisher unklar ist,ob dies ein direkter Effekt ist oder ob er indirekt,beispielsweise über eine infolge der glykosidbedingten Hemmung der Na^+,K^+-ATPase ausgelösten regionalen Na^+-Erhöhung ausgelöst wird.Dies zu klären war der Grund dafür,uns näher mit der Isolierung und pharmakologischen Beeinflussung der aktiven Ca^{2+}-Pumpe zu beschäftigen.

1.3 Erwartungen und Ziele

In der Vergangenheit hat es bereits einige Autoren gegeben,die mit verschiedenen Methoden Sarkolemma isoliert haben (2,10,17,23,26,40,44). Das Problem bei der Präparation besteht darin,Verunreinigungen durch SR und funktionstüchtige Mitochondrien zu verhindern.Eines der Ziele dieser Arbeit bestand deshalb darin,eine möglichst optimale Präparationsmethode zu entwickeln.Da das SL nach erfolgreicher Isolierung zu gleichen Teilen in Vesikeln von "Inside-out" und "Right-side-out"-Orientierung vorliegt,strebten wir an,diese voneinander zu trennen. Auf diese Weise sollte eine zusätzliche Reinigung der Ca^{2+}-Pumpe möglich sein,die wegen ihrer besonderen räumlichen Verankerung an der Innenseite der Plasmamembran nur bei den "Inside-out" orientierten Vesikeln direkt experimentell zugänglich ist.Weiterhin sollte der Prozeß

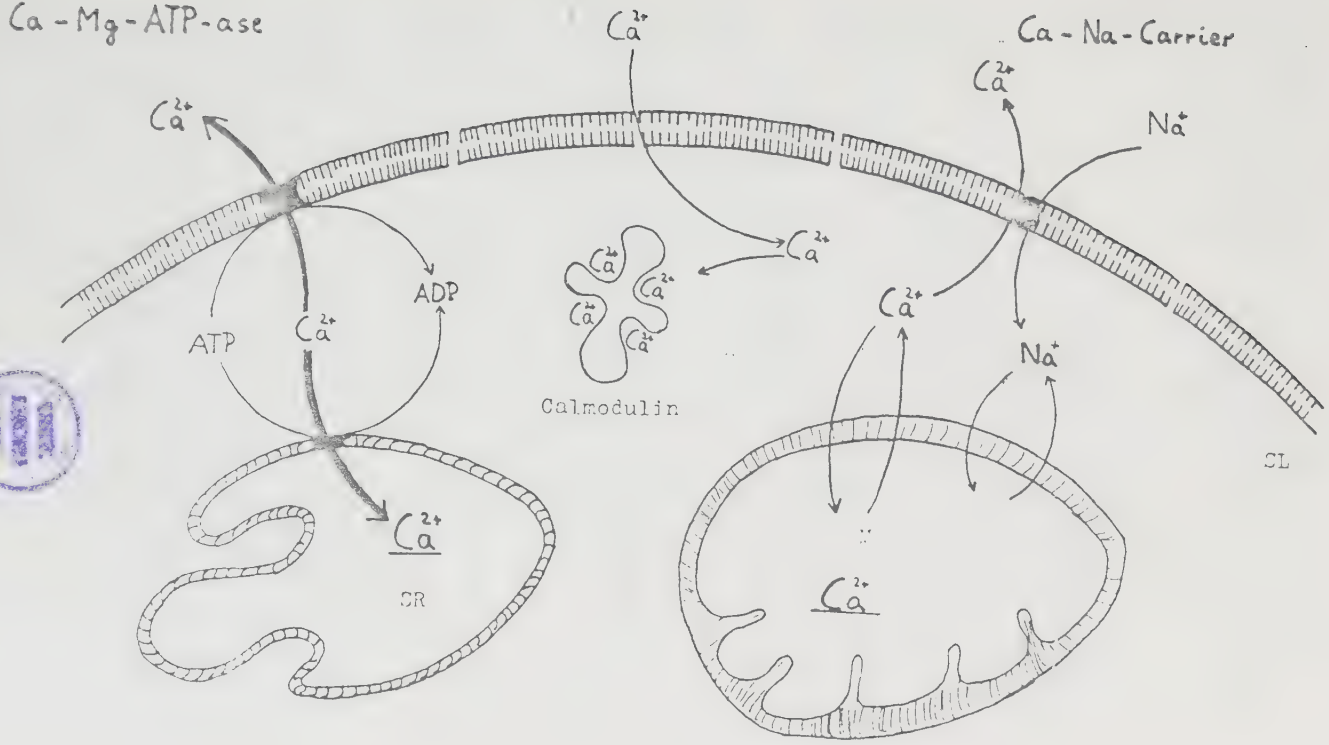


Abb. 1 : Ca^{2+}-Transport in der Herzzelle

M : Mitochondrium , SL : Sarkolemma , SR : Sarkoplasm. Retikulum

der Ca^{2+}-Aufnahme in die "Inside-out" Vesikel näher analysiert werden, um auf diese Weise eine Erklärung für die Beeinflussung des zellulären Ca^{2+}-Haushaltes durch Digitalisglykoside und andere Pharmaka auffinden zu können.

2. Methodischer Teil

2.1 Präparation nach Levitsky et al. (19,23,52)

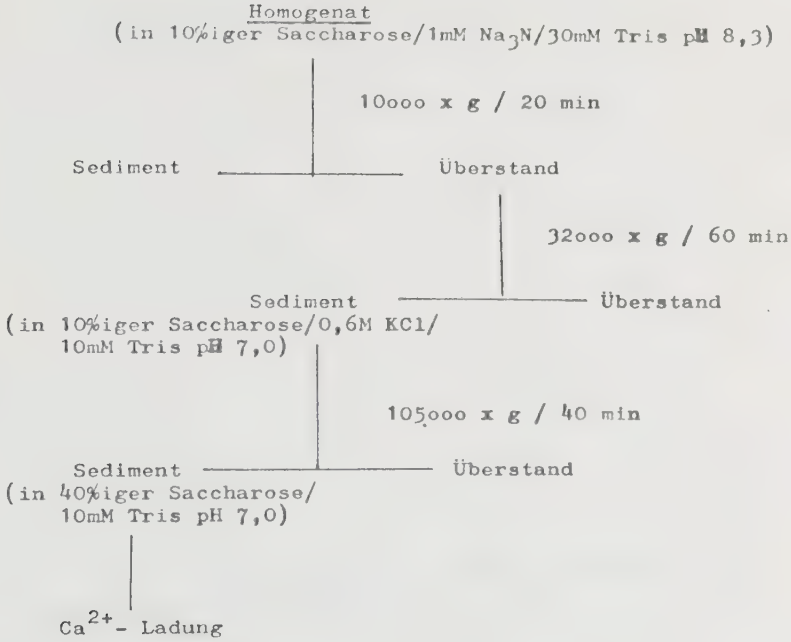
Der Präparation der Sarkolemma-Mikrosomen liegt ihre teilweise Beladung mit Calcium in Gegenwart von Oxalationen und anschließende Sedimentierung der durch die Beladung schwerer gewordenen Vesikel durch Saccharose-Gradientenzentrifugation zugrunde. Hierdurch werden Sarkoplasmatisches Retikulum und Sarkolemma getrennt (s. Schema 1).

2.1.1 Frisch geschlachteten Kaninchen wurde das Herz entnommen und in eiskalten Puffer gegeben, der 10%-ige Saccharose, Natriumazid (1mmol/l) und Tris-HCl (30mmol/l), ph 8,3, enthielt.

Das Herz wurde von Fett und Gefäßen befreit und anschließend in 40 ml des gleichen Puffers 30 Sekunden lang homogenisiert.

2.1.2 Zellkerne, Zelltrümmer, Myofibrillen und Mitochondrien wurden danach durch 20-minütige Zentrifugation mit 10.000 x g in einer Sorvall-Zentrifuge (Superspeed RC 2-B) sedimentiert. Der Überstand wurde durch einige Lagen Gaze gegeben und bei 32.000 x g für 60 Minuten zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge LS 50, Rotor SW 41).

Präparation nach Levitsky/Wollenberger



Schema 1

Der erhaltene Überstand wurde in einem Puffer aufgenommen, der 10%-ige Saccharose, KCl (0,6 mol/l) und Tris-HCl (10 mmol/l), pH 7,0 , enthielt. Darauf folgte zur Entfernung von Actomyosin eine Zentrifugation bei 105.000 x g (Beckmann Zentrifuge LS 50) für 40 Minuten. Das erhaltene Sediment wurde in 40%-iger Saccharose aufgenommen , die Tris-HCl (10 mmol/l), pH 7,0 , enthielt und gepottert.

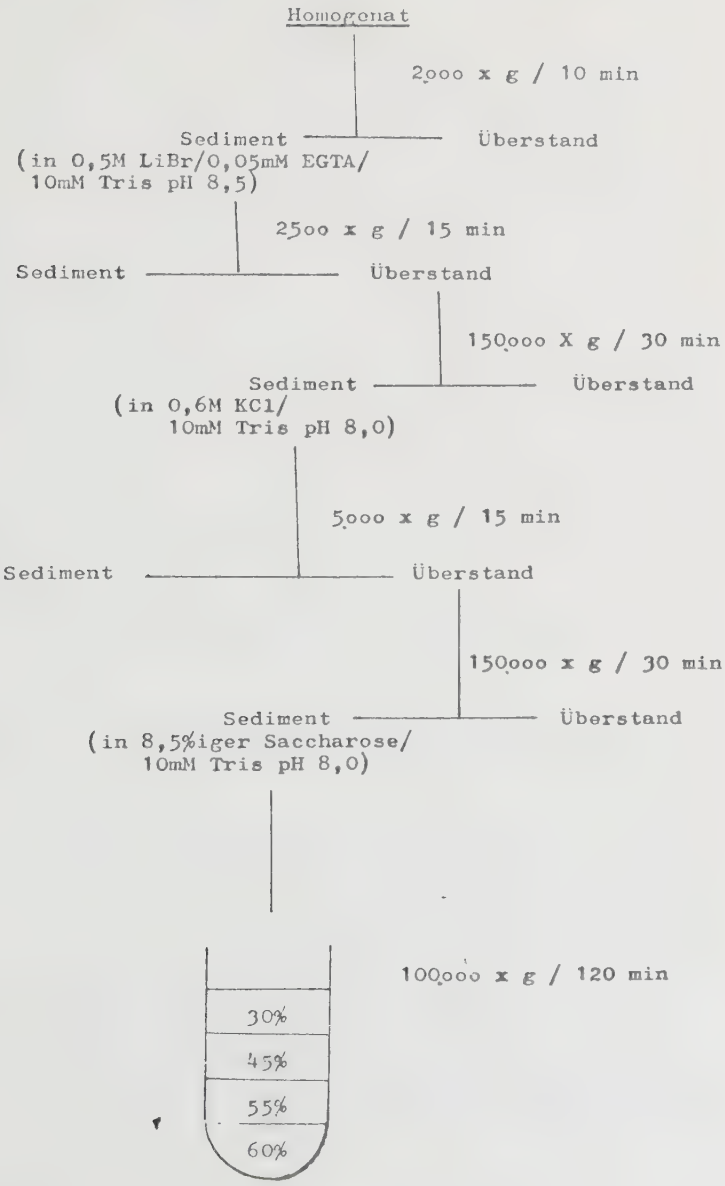
2.1.3 Zur "Beladung" der Mikrosomen wurde zu der erhaltenen Suspension das gleiche Volumen einer Lösung gegeben, die ATP (20 mmol/l), $MgCl_2$ (25 mmol/l), NaN_3 (10 mmol/l), K-Oxalat (20 mmol/l) und Tris-HCl (60 mmol/l), pH 7,0 , enthielt.

Unter Konstanthaltung des pH wurde anschließend Tropfenweise $CaCl_2$ (0,1 mol/l) zugegeben. Nach 30 Minuten wurde der Beladungsvorgang durch Millipore-Filtration beendet. Die Aktivität des radioaktiven Calciums wurde danach im Beckmann Szintillationszähler LS 9.000 in Überstand und Sediment bestimmt, um das Ausmaß der vesikulären Calciumspeicherung quantitativ beurteilen zu können.

2.2 Präparation nach Schapira et al. (40)

Die Präparation von Schapira bedient sich zur Membrananreicherung der LiBr-Extraktion. Die Isolierung des Sarkolemmas erfolgt anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation (s. Schema 2).

Präparation nach Schapira et al.



2.2.1 Frisch geschlachteten Kaninchen wurde das Herz entnommen und in einen eiskalten Puffer gegeben, der 10%-ige Saccharose und Tris-HCl (1 mmol/l), pH 7,4 , enthielt. Das von Fett und Gefäßen gesäuberte Herz wurde dann in 30 ml des Aufnahmepuffers mit einem Polytron-Gerät 15 Sekunden lang homogenisiert.

2.2.2 Das Homogenat wurde durch einige Lagen Gaze filtriert und dann 10 Minuten bei 2.000 x g zentrifugiert (Sorvall Superspeed RC 2-B) (39). Zur Herauslösung der kontraktilen Elemente wurde das Sediment in 40 ml LiBr (0,5 mol/l), pH 8,5 , aufgenommen und die Suspension mittels eines Magnetrührers bewegt.

Die Lösung wurde danach 15 Minuten bei 2.500 x g zentrifugiert, das Sediment dekantiert und der Überstand bei 150.000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert (Beckmann LS 50, Rotor SW41). Der erhaltene Niederschlag wurde in 40 ml KCl (0,6 mol/l), Tris-HCl (10 mmol/l), pH 8,0 aufgenommen und anschließend 10 Minuten stehengelassen.

Darauf folgte eine Zentrifugation bei 5.000 x g für 15 Minuten. Der Überstand wurde dann bei 150.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert.

Das Sediment wurde in 8,5%-iger Saccharose und Tris-HCl (10 mmol/l) aufgenommen und auf einen fünfstufigen diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten gegeben (30%, 45%, 50%, 55%, 60%).

Nach einer 2-stündigen Zentrifugation bei 100.000 x g ergaben sich drei Fraktionen.

2.2.3 Die Trennung der einzelnen Banden erfolgte mittels eines Fraktionators (Isco-Density-Gradient-Fraktionator Model 640).Die einzelnen Proteinfraktionen wurden dazu mit der 60%-igen Saccharoselösung durch den Lichtweg eines im UV-Bereich absorbierenden Photometers gedrückt (Isco-Absorbance-Flourescence-Monitor Model UA 5).
Dazu wurde das Zentrifugenröhrchen am Boden mit einer Kanüle angestochen,durch die 60%-ige Saccharoselösung mit gleichbleibender Geschwindigkeit hindurchgedrückt wurde.Die durch das Photometer angezeigten Banden wurden in einem Fraktionssammler tropfenweise wieder aufgefangen und fraktioniert.Die das Protein enthaltenden Röhrchen ließen sich aufgrund der auf einem Einkanalschreiber registrierten Absorptionsbanden identifizieren (s. Abb.2).

2.3 Präparation nach St. Louis und Sulakhe (43,44)

Für die Isolation von Sarkolemma nach der Methode von St. Louis und Sulakhe wird die Extraktion mittels KCl und eine daran anschließende zweimalige Dichtezentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten verwendet (s. Schema 3).

2.3.1 Das frisch geschlachteten Kaninchen entnommene Herz wurde in einen eiskalten Tris-HCl Puffer (10 mmol/l), pH 7,5 ,gegeben,der DTT (2 mmol/l) enthielt (T-D Puffer).

Anschließend wurde das Herz von Gefäßen und Fett befreit und mit einer Schere zerkleinert.Der erhaltene Gewebebrei wurde in 30 ml T-D Puffer aufgenommen und in einem Starmix zuerst 15 sec bei niedriger,dann weitere 15 sec bei hoher Geschwindigkeit homogenisiert.Daraufhin wurde das Homogenat mit KCl (4 mol/l) in T-D Puffer bis zur Endkonzentration von 1,25 mol/l versetzt und danach 10 min auf Eis gerührt.

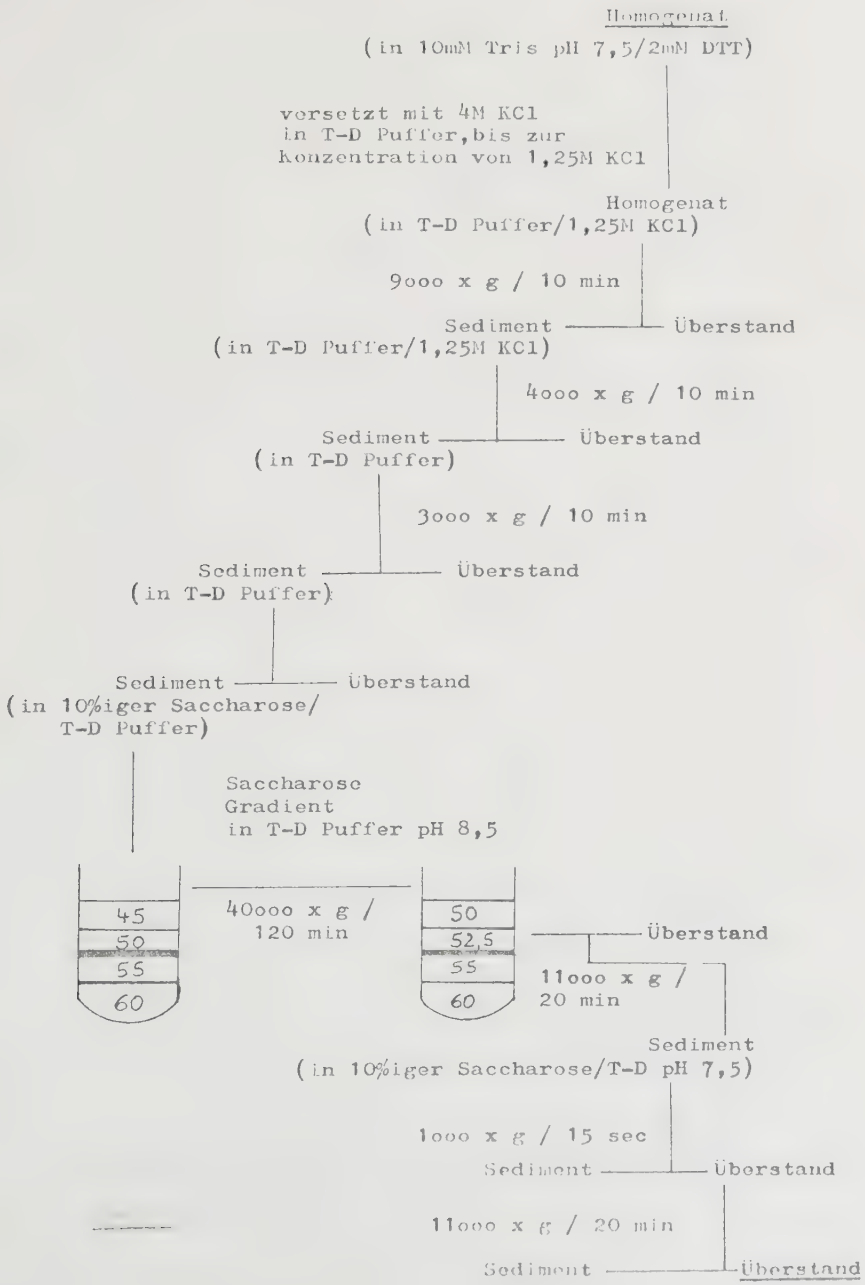
2.3.2 Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 9.000 x g (Sorvall Zentrifuge RC 2-B) wurde dekantiert und der Rückstand in 10 Volumenteilen (des ursprünglichen Herzgewichtes) KCl (1,25 mol/l) in T-D Puffer suspendiert.Danach wurde die Suspension 10 Minuten stehengelassen und dann für 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Es folgte zweimaliges Waschen des Rückstandes durch Suspendierung in T-D Puffer und anschließendes 10-minütiges Zentrifugieren bei 3.000 x g .Der hierbei erhaltene Rückstand wurde in 10%-iger Saccharose in T-D Puffer aufgenommen und auf den ersten diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten gegeben,der jeweils 7 ml 45%-ige, 50%-ige, 55%-ige und 8 ml 60%-ige Saccharoselösung in T-D Puffer, pH 8,2 ,enthielt.

Die Zentrifugation bei 40.000 x g (Beckmann LS 50, Rotor SW 27) für 1 Stunde ergab folgende Fraktionen:

F_1: 10 % - 45 % F_2: 45 % - 50 %

F_3: 50 % - 55 % F_4: 55 % - 60 %

Präparation nach St. Louis und Sulakhe



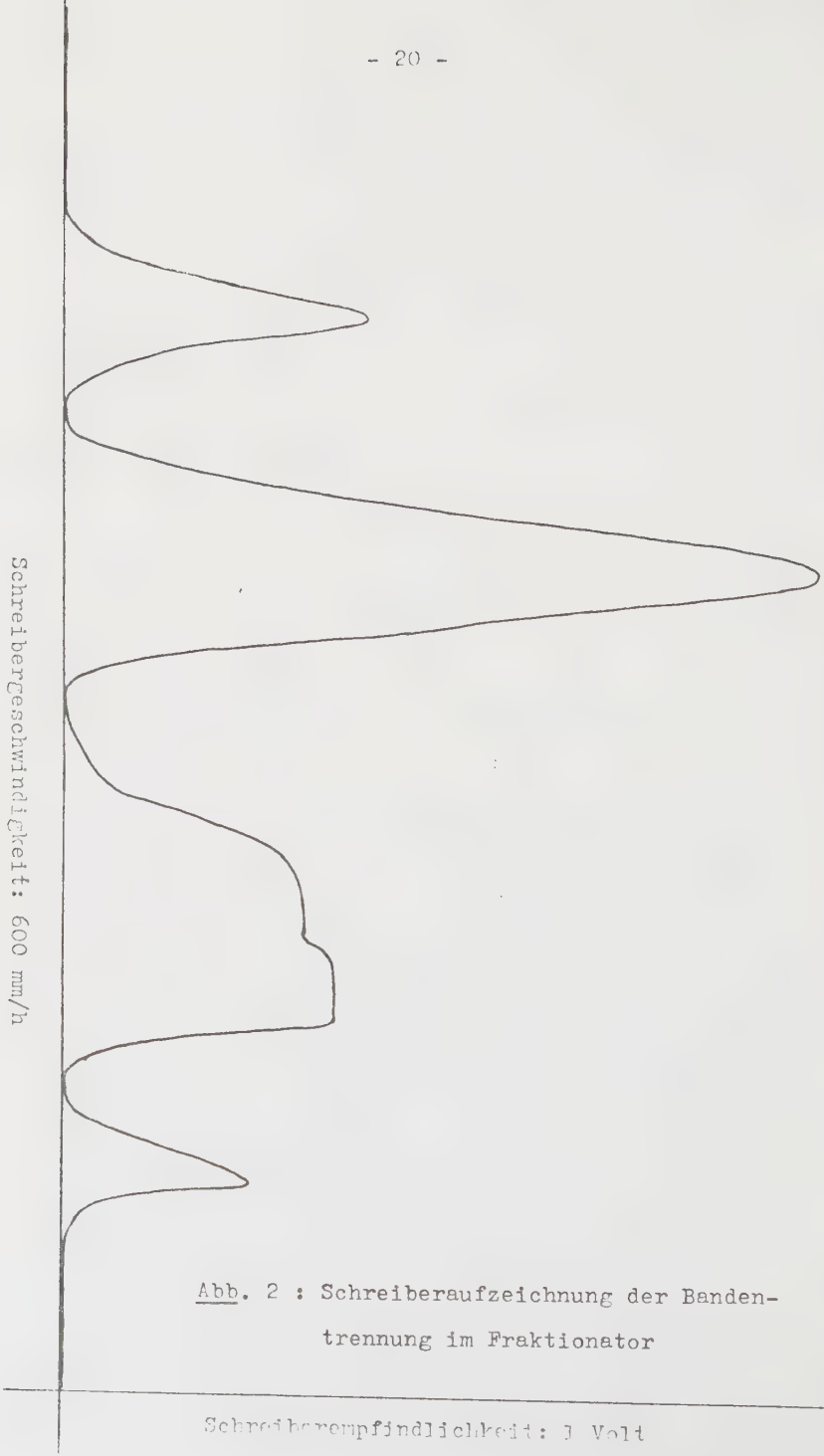


Abb. 2 : Schreiberaufzeichnung der Bandentrennung im Fraktionator

Nach Fraktionierung der einzelnen Banden (Isco-Fraktionator Model 640) wurden die gewonnenen Banden im Volumenverhältnis von 3 : 1 mit T-D Puffer ,pH 7,5 verdünnt und 20 min bei 11.000 x g zentrifugiert.Der Rückstand wurde anschließend in 10% Saccharose enthaltendem T-D Puffer aufgenommen.

Die Fraktion F_3 gaben wir danach auf einen diskontinuierlichen Gradienten,der jeweils 7 ml 50%-ige, 52%-ige, 55%-ige und 8 ml 60%-ige Saccharose in T-D Puffer, pH 8,2 ,enthielt.

Es folgte eine einstündige Zentrifugation bei 40.000 x g (Beckmann LS 50, Rotor SW 27).Die einzelnen Fraktionen

F_{3A}: 10 % - 50 % F_{3B}: 50 % - 52,5 %

F_{3C}: 52,5 % - 55 % F_{3D}: 55 % - 60 %

wurden mittels Fraktionator getrennt.

Danach wurden die Fraktionen mit T-D Puffer auf das dreifache Volumen verdünnt und bei 11.000 x g 20 Minuten zentrifugiert.Die Rückstände wurden in 10%-iger Saccharose in T-D Puffer, pH 7,5 ,suspendiert.Zur weiteren Reinigung wurde die Fraktion F_{3C} für 15 sec bei 1.000 x g zentrifugiert,der Überstand mit einer Eppendorf-Pipette abgezogen und nach Resuspension bei 11.000 x g für 20 min zentrifugiert.Das Sediment wurde in T-D Puffer, pH 7,5 , aufgenommen und für die weiteren Versuche bei 0° - 4° C im Kühlraum aufbewahrt.

2.3.3 Die bereits unter 2.3.2 erwähnte Trennung der Zonen im diskontinuierlichen Saccharosegradienten erfolgte mit Hilfe eines Fraktionators der Firma Isco. Die einzelnen Banden konnten auf diese Weise sauber getrennt weden.Im Fraktionssammler erfolgte nach jeweils 1,2 ml abtropfender Suspension ein automatischer Transport der Zentrifugenröhrchen.Dieser Röhrchenwechsel wurde zusammen mit den Extinktionswerten des Photometers auf einem Schreiber aufgezeichnet.Daher ließen sich nach Fraktionierung die einzelnen Banden des Dichtegradienten mühelos den entsprechenden Elutionszentrifugenröhrchen zuordnen.

3. Experimenteller Teil

3.1 Die Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte nach der Methode von O.H. Lowry et al. (20) mit Folin-Reagenz.Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sie für kleine Mengen an Protein geeignet ist.Die Empfindlichkeit ist ca. 100 mal höher,als die der Biuret-Reaktion.

Folgende Reagentien wurden benötigt:

1. Na_2CO_3	10,0 g	H_2O ad 500 ml
NaOH	2,0 g	
2. Na-Tatrat	1,0 g	H_2O ad 100 ml
3. $CuSO_4$	0,5 g	H_2O ad 100 ml

4. Zur Messung wurden gemischt:

50 ml der Lösung 1
1 ml " " 2
1 ml " " 3

5. Folin Phenol-Reagenz (5)

Protein: 0,1 ml Probe plus 0,9 ml H_2O

Leerwert: 1 ml H_2O

Versuchsansatz:

5 ml der Lösung 4 plus 1 ml Probe oder Leerwert bei 37° C für 3 min inkubieren. Dann Zugabe von 0,5 ml Folin-Reagenz und weitere Inkubation bei 37° C für 20 min.
Messung bei 700 nm gegen den Leerwert.
Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin hergestellt.

3.2 Enzymbestimmungen - O_2 Atmungsmessung (oxidative Phosphorylierung) - Ouabain Bindungsstudie

Die Bestimmung der mitochondrialen bzw. sarkoplasmatischen Markerenzyme Cytochrom-C-Oxidase und NADPH Cytochrom-C-Reduktase, sowie die Atmungsmessung wurden in kontinuierlichen Messungen vorgenommen, dh., Bildung bzw. Verbrauch eines Substrates also fortlaufend registriert.

3.2.1 Cytochrom-C-Oxidase

Als mitochondriales Markerenzym wurde die Cytochrom-C-Oxidase bei Zimmertemperatur nach Cooperstein und Lazarow (4) bestimmt. Das Reaktionsgemisch bestand aus:

Cytochrom-C 40 µmol/l in Phosphatpuffer pH 7,0 , 20° C	2 ml
Ascorbinsäure, 20 µmol/l frisch angesetzt	5 µl

Start mit 20 µl Protein (ca. 1 mg/ml)

Kontinuierliche Messung der Reaktion mit einem Beckmann Spectral-Photometer Mod. 25 bei 550,3 nm. Registrierung der abfallenden Extinktion auf einem angeschlossenen Schreiber (1 A ; 0,5 inch/min).

Zur Ermittlung der Absorbtionsmaxima von reduzierter und oxidierter Form der Cytochrom-C-Oxidase wurde ein Spektrum aufgenommen (s. Abb. 3). Maximale Reduktion wurde durch Ascorbinsäure, maximale Oxidation durch KCN erreicht. Weiterhin wurde eine Eichkurve mit verschiedenen Konzentrationen von reduziertem Cytochrom-C angefertigt, um optimale Ausgangsbedingungen für die Reaktion zu schaffen.

3.2.2 Die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase eignet sich als Marker für das Sarkoplasmatische Retikulum (37).

Die Bestimmung erfolgte nach Donaldson et al. (1972)

Reaktionsgemisch:

Phosphatpuffer pH 7,0, 150 mmol/l Cytochrom-C, 40 mmol/l	1 ml
KCN, 1 mmol/l	1 ml
Antimycin A in Äthanol, 2 mg/ml	20 µl
Proteinsuspension, 1 mg/ml	20 µl

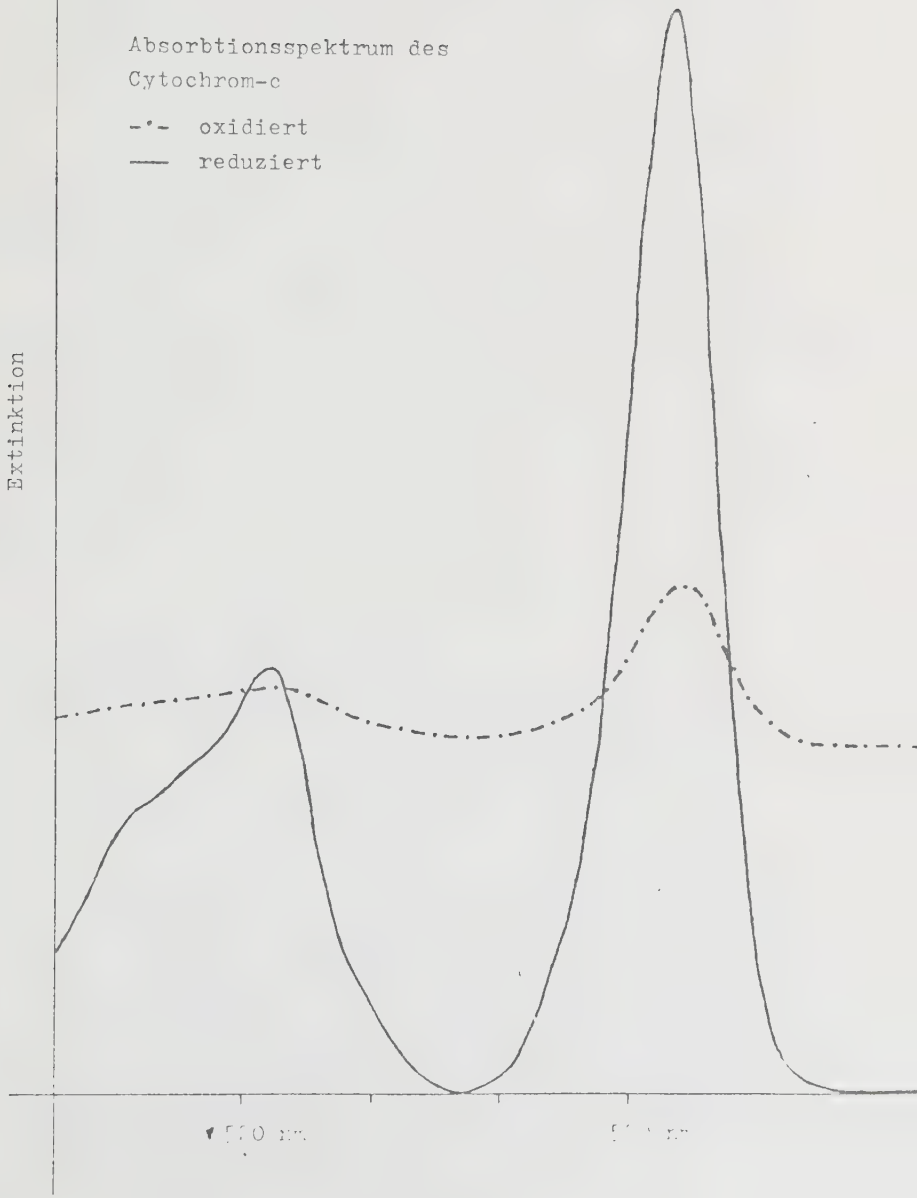

Absorbtionsspektrum des
Cytochrom-c
oxidiert
reduziert
Extinktion

Abb. 3

Start mit NADPH, 8,6 mg/ml in Bicarbonatpuffer pH 10,4 — 20 µl

Messung bei 550,3 nm gegen den Leerwert mit Beckmann Spectralphotometer und angeschlossenem Schreiber (Servogor RE 520, 0,1 inch/min).

3.2.3 Mit Hilfe der polarographischen Atmungsmessung läßt sich der Grad einer mitochondrialen Kontamination überprüfen. Die Messung beruht auf der Tatsache, daß bei der funktionierenden Atmungskette an der Innenmembran der Mitochondrien Sauerstoff verbraucht wird. Mittels einer Clarkschen Sauerstoffelektrode und eines Computers (Dietz) ließ sich die Atmungstätigkeit der Proteinsuspension on-line verfolgen und der Sauerstoffverbrauch in nmol O_2/mg x min berechnen. (Methode nach Prof. Noack, Habilitationsschrift) Dazu wurden die gewonnenen Proteinfraktionen (ca. 1 mg/ml) zu 2,5 ml eines Inkubationsmediums mit folgender Zusammensetzung gegeben:

Tris-Glutamat	10,0 mmol/l
Natriumfumarat	2,5 mmol/l
Magnesiumchlorid	5,0 mmol/l
Mannit	184,5 mmol/l
Anorganisches Phosphat	5,0 mmol/l
Saccharose	70,4 mmol/l
Tris-HCl	8,8 mmol/l

Nach luftblasenfreiem Aufsetzen der Sauerstoffelektrode wurde das Inkubationsgefäß in ein Wasserbad von 25° C getaucht. Die dem jeweiligen Sauerstoffgehalt entsprechende Stromstärke wurde über einen Verstärker PHM 72 der Firma Radiometer/Kopenhagen auf einen Zweikanalkomponentenschreiber (RE 520, Servogor) gegeben, so daß der Vollausschlag des Zeigers 20,9 Vol.% Sauerstoff entsprach und 0 Vol.% Sauerstoff mit der Nullinie des Schreiberpapiers übereinstimmte. Die Zeitmessung erfolgte computerintern. Durch ein spezielles Rechenprogramm wurden die erhaltenen Meßdaten in einem Dietz Computer (Mincal 602) so errechnet, daß die wichtigsten Parameter der oxidativen Phosphorylierung unter Berücksichtigung von Luftdruck und Temperatur direkt nach jeder Messung ausgedruckt werden konnten.
Zur Beurteilung der mitochondrialen Verunreinigung wurde in den Fraktionen nur die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs in Gegenwart von Substrat in Abwesenheit von ADP (sog. State-4-Atmung) bestimmt.

3.2.4 Na^+,K^+-ATPase: Marker-Enzym für das Sarkolemm (4) und Ca^{2+}-ATPase: Marker-Enzym für das Sarkoplasmatische Retikulum

Die Bestimmung erfolgte mit einem diskontinuierlichen Verfahren bei 37° C. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit TCA gestoppt und anorganisches Phosphat nach Fiske und Subbarow bestimmt.

Reaktionsgemisch		Messung der Enzymaktivitäten			
		Gesamt (ml)	Mg^{2+} (ml)	Ca^{2+} (ml)	Leerwert (ml)
Tris-HCl pH 7,5	250 mmol/l	0,2	0,2	0,2	0,2
EGTA	1 mmol/l				
$MgCl_2$	25 mmol/l				
NaCl	1 mmol/l	0,1	0,1	-	-
KCl	150 mmol/l	0,1	0,1	-	-
Ouabain	3 mmol/l	-	0,1	0,1	-
$CaCl_2$	10 mmol/l	-	-	0,2	-
Protein	ca. 1 mg/ml	0,1	0,1	0,1	-
H_2O		0,4	0,3	0,3	0,7
Start: ATP	50 mmol/l	0,1	0,1	0,1	0,1

Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Proben ins Eisbad überführt und 1 ml 10% Trichloressigsäure hinzugefügt. Dann wurden die Zentrifugenröhrchen 10 min lang bei 11.000 x g zentrifugiert.

Für die Farbreaktion wurden nun zusammenpipettiert:

1,0 ml Probe (Überstand)

4,0 ml NaH_2SO_4 , 0,4 mol/l

0,4 ml Ammoniummolybdat, 2,5%

0,2 ml ANSA

Leerwert:	4,0 ml NaH_2SO_4	0,4 mmol/l
	0,4 ml Ammoniummolybdat	2,5 %
	0,2 ml ANSA	
	0,5 ml H_2O	
	0,5 ml TCA	10 %

ANSA = Aminonaphtolsulfonsäure 0,5 g, gelöst in 195 ml 15%-igem Natriumpyrosulfit und 5 ml 20%-igem Natriumsulfit Na_2SO_3

Nach 30 Minuten erfolgte die Messung der Extinktion bei 700 nm gegen den Leerwert.Zur Bestimmung der Phosphatkonzentration wurde eine Eichkurve mit KH_2PO_4 hergestellt.

Die Differenz zwischen Gesamtaktivität und Mg^{2+}-Aktivität ergab die Na^+,K^+-ATPase Aktivität.Die Differenz zwischen Gesamt- und Mg^{2+}-Aktivität ergab die Ca^{2+}-ATPase Aktivität.

3.2.5 Ouabain-Bindung

Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung der Sarkolemma-Fraktion eignet sich die spezifische Bindung von $[^3H]$-markiertem Ouabain (53).

Ouabain besitzt eine hohe Bindungsaffinität zur Na^+,K^+-ATPase.Die Anlagerung scheint die Voraussetzung für die Auslösung der pharmakologischen Wirkung zu sein.

Reaktionsgemisch:		Probe	Leerwert
Tris-HCl pH 7,5	100 mmol/l	2,5 ml	2,5 ml
NaCl	400 mmol/l		
$MgCl_2$	10 mmol/l		
Na_2ATP	50 mmol/l	0,5 ml	-
$[^3H]$-Ouabain	0,1 µmol/l	0,5 ml	0,5 ml
H_2O		1,0 ml	1,5 ml
Protein ca. 1 mg/ml		1,0 ml	1,0 ml

Anschließend Inkubation bei 37° C für 30 Minuten. Eine Inkubationszeit von 20 Minuten ist bereits ausreichend zur Einstellung des Gleichgewichts der Bindungsreaktion.

1 ml des Reaktionsgemischs wurden in 4 ml eiskalte Waschlösung gegeben. Unmittelbar darauf wurde die Suspension durch ein Millipore-Filter abgesaugt und mit weiteren 4 ml Waschlösung nachgespült. (Millipore Absaugsystem mit Öl-Vakuumpumpe, Porengröße 0,45 um, Durchmesser 25 mm)

Waschlösung: Tris-HCl 50 mmol/l pH 7,5
Ouabain 0,2 mmol/l

Die Cellulose-Filter wurden ca. 30 Minuten luftgetrocknet, anschließend in Szintillationsfläschchen aus Plastik gegeben und dann mit 0,5 ml Äthylenglykolmonoäthyläther aufgelöst. Nach Zufügen von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve 1) wurden die Proben (Doppelwerte) im Szintillationszähler (Beckmann LS 9.000) ausgezählt.

3.3 Ca^{2+}-Aufnahme

Die Messung der Ca^{2+}-Aufnahme der Plasmalemmavesikel, beschrieben beim Skelettmuskel (4) und beim Herzmuskel, erfolgte bei Zimmertemperatur in folgendem Reaktionsgemisch:

Tris-HCl pH 7,4	500 mmol/l	200 µl
$MgCl_2$	50 mmol/l	200 µl
KCl	1 mol/l	200 µl
$[^{45}CaCl_2]$	240 µmol/l	500 µl
EGTA	25 mmol/l	200 µl
H_2O		200 µl
Start der Reaktion mit ATP 50 mmol/l		10 µl

Die Abnahme von 200 µl-Aliquots erfolgte in der Regel nach 1, 3, 6, 10 und 15 min.
Die abgenommenen Proben wurden direkt auf ein Millipore-Filter mit 0,45 um Porengröße pipettiert. Danach wurde sofort abgesaugt und mit 7 ml Puffer (KCl 100 mmol/l, Tris-HCl 50 mmol/l pH 7,4) nachgewaschen. Die Millipore-Filter wurden danach 30 Minuten getrocknet, aufgelöst, mit Szintillationsflüssigkeit (Unisolve 1) versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler (Beckmann LS 9.000) bestimmt. (s. auch Ouabain-Bindungsstudie)

3.4 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen verdanke ich

Vergrößerung : 40.000 fach

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vesikeln der Fraktion F3C

Herrn Prof. Borchard vom Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf.

Die Membranen (F3C) wurden unmittelbar nach der Präparation in 2 %igem Glutaraldehyd in Natrium-Cocodylat-Puffer (0,1 mol/l), pH 7,35, fixiert. Die Nachfixierung erfolgte in 2 %igem Osmiumtetroxid (O_sO_4) in Cocodylat-Puffer und aufsteigender Alkoholreihe. Nach Einbettung in Epoxidharz wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

3.5 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde nach der Methode von Weber und Osborn durchgeführt (7,51).

Das Polyacrylamid-Gel entsteht aus der Polymerisation von Acrylamid-Monomeren. Die Polymerisation der Acrylamid-Monomere wird durch die Gegenwart von freien Radikalen ausgelöst. Dazu wird als Katalysator NNN'N'-Tetramethylendiamin zugegeben.

Zur elektrophoretischen Proteintrennung mit dem LKB 2117 Multiphor wurden 10 %ige Polyacrylamidplatten von ca. 8 cm Höhe und 0,3 cm Dicke gegossen.

Als weitere Voraussetzung für die Elektrophorese mußten alle Proteine in Lösung gebracht werden. Dazu wurde SDS, das sich an die Eiweiße bindet und 2-Mercaptoäthanol, das Disulfidbrücken aufbricht, zu den Proben gegeben und 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Dann wurde eine Vorlauf-Elektrophorese mit 80 mA für 10 min bei

4° C (Wasserkühlung) durchgeführt. Nach Auftragen der Proteine (5 µl/Protein-Konzentration ca. 1 mg/ml) an der Kathode erfolgte eine 20-minütige Focussierung bei 20 mA. Der sich anschließende Lauf zur Anode wurde für 2 Stunden mit 100 mA durchgeführt. (Laufpuffer: Tris-Glycin pH 8,9; Kontrolle der Lauffront mit Bromphenolblau). Unmittelbar nach dem Lauf wurde das Polyacrylamidgel von der Unterlage gelöst und für 1 Stunde in Fixierlösung gelegt. Nach kurzem Waschen in Entfärbelösung konnte das Gel für 2 Stunden in die Färbelösung gegeben werden. Danach erfolgte die Entfärbung des Gels - ca. 1 Stunde - unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung.
Abschließend wurde noch eine 1-stündige Konservierung des Gels in Konservierungslösung vorgenommen.

Fixierlösung: 57,5 g TCA und 17,25 g Sulfosalicylsäure gelöst in destilliertem Wasser (500 ml)

Entfärbelösung: 500 ml Äthanol und 160 ml Essigsäure ad 2 l destilliertem Wasser

Färbelösung: 0,18 g Serva-Blue-R in 400 ml Entfärbelösung lösen, dann durch Papierfilter geben, nur 1 x benutzen

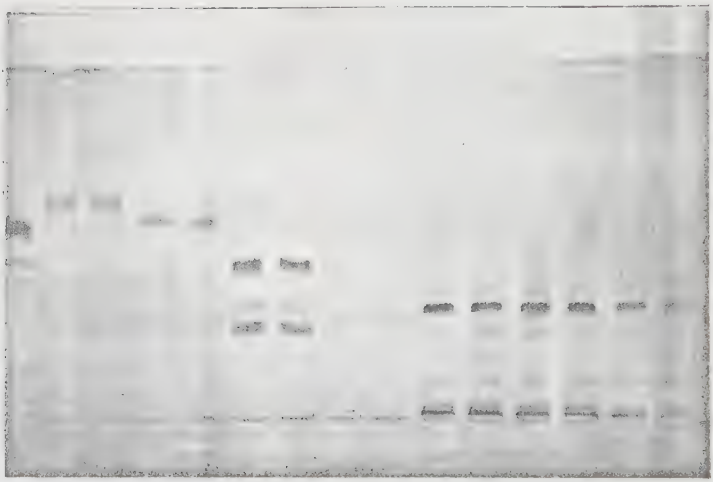
Konservierungslösung: 40 ml Glycerin auf 400 ml Entfärbelösung

Zur Aufbewahrung wurde das Gel wieder auf die Glasplatte gelegt und mit Zellophan abgedeckt. Wie auf den Photos ersichtlich, ergab die elektrophoretische Fraktionierung ca. 20 verschiedene Banden. Zur Molekulargewichtsbestimmung (7) der beiden stärksten Banden wurden folgende Eichproteine verwendet:

Cytochrom C	MG 12.300
Carboanhydrase	MG 29.000
Ovalbumin	MG 45.000
Transferrin	MG 80.000
γ-Globulin	MG 150.000

Die Laufstrecke der Proteine wurde ins Verhältnis zur Bromphenolfront gebracht, um auf diese Weise die relative Beweglichkeit zu erhalten.
Die Auftragung der logarithmierten Molekulargewichte gegen die relative Beweglichkeit ergab eine Gerade. Durch die Bestimmung der relativen Beweglichkeit der beiden Hauptbanden der Fraktion F3C ließ sich das Molekulargewicht aus der Eichkurve direkt ablesen, bzw. errechnen (s. Abb. 4). Dabei ergaben sich für die beiden Proteine Molekulargewichte von 107.000 und 55.000 (s. auch 13,14,41,42).

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese



Eichproteine / Fraktion F3C

Typischer Verlauf einer elektrophoretischen Proteintrennung in Polyacrylamidgel.

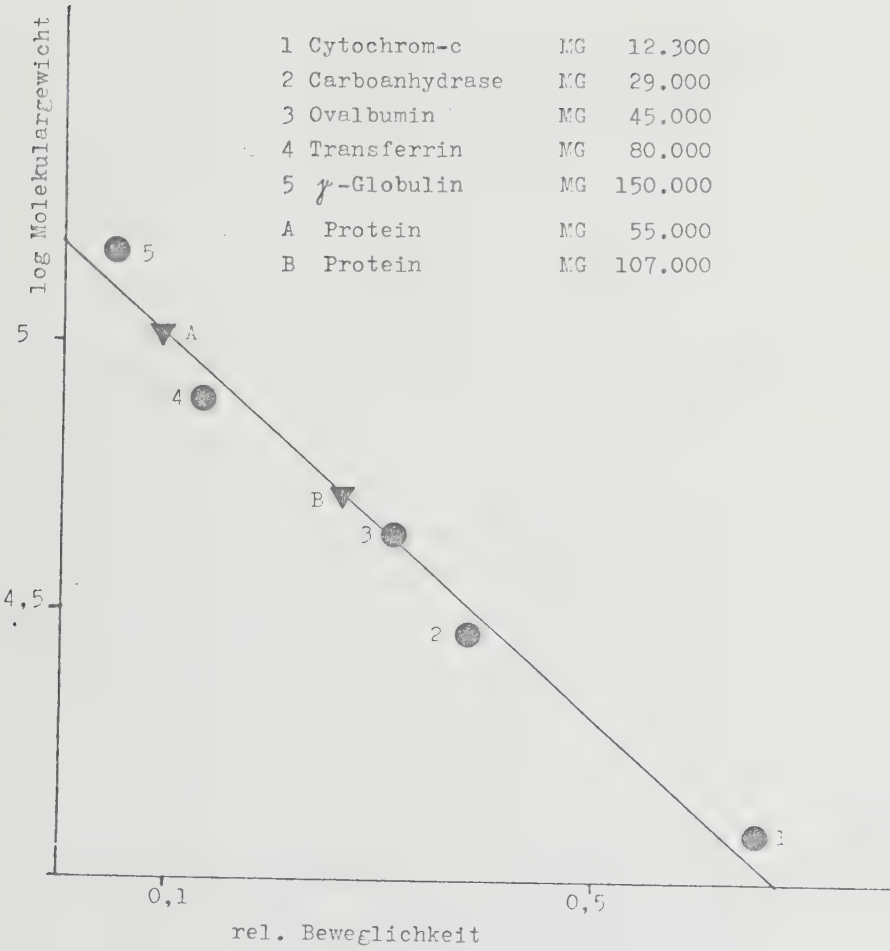


Abb. 4 : Ermittlung der Molekulargewichte der Proteine A und B

3.6 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Gleichung $V = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S}$ definiert die quantitative Beziehung zwischen der Geschwindigkeit einer Enzymreaktion und der Substratkonzentration. Zur Erleichterung der Darstellung der Versuchsergebnisse kann die Michaelis-Menten-Gleichung in eine andere mathematische Form überführt werden, die nach Lineweaver und Burk benannt ist.

Die reziproke Darstellung $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$ ist die Lineweaver-Burk-Gleichung. Sie stellt eine Gerade mit der Steigung Km/Vmax und einem y-Achsenabschnitt von $\frac{1}{V_{max}}$ dar.

Diese Gerade erhält man, wenn man $\frac{1}{V}$ gegen $\frac{1}{S}$ in einem Koordinatensystem aufträgt.

In unserem Falle wurde die doppelt reziproke Darstellung so vorgenommen, daß die Ca^{2+}-Aufnahme der Vesikel bei 50, 60, 100 und 250 µmol/l $CaCl_2$ gemessen wurde.

3.7 Affinitätschromatographie

Da die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Membranvesikel aus Plasmalemma in zwei Orientierungen vorliegen können, wurde eine Trennung von "Inside-out" und "Right-side-out"-Vesikeln versucht.

Es ist bekannt, daß auf der Oberfläche der Herzzellmembranen die sogenannte Glykokalix vorhanden ist. Diese

setzt sich chemisch aus Glycoproteinen und Glycolipiden zusammen, die eine besondere Neigung haben, sich an Lectine anzulagern.

Als geeignet für die Trennung der Vesikel erwies sich daher die Wheat-germ-lectine-Sepharose 6MB (9). Die Eigenschaft dieses Lectins besteht darin, Moleküle anzulagern, die terminale N-Acetyl-Galactosamin-Gruppen enthalten. Insbesondere die Vesikel in der "Right-side-out"-Orientierung mit ihrer durch Glycocalix gebildeten Oberfläche konnten so durch Lectinbindung von den "Inside-out"-Vesikeln getrennt werden.

Säulentest

Vor dem Einsatz der Säule erfolgte eine Aktivitätsbestimmung der Weizenkeimlectin-Sepharose 6MB.

Um ausreichend funktionstüchtig zu sein, mußte die WGL-Sepharose mindestens 1 mg Ovomucoid/ml binden können. Der Test erfolgte durch Aufbringen einer Lösung aus

Na-phosphat 0,5 mol/l + NaCl 0,2 mol/l
+ Na-azid 0,02 %
+ Protein 2 mg/ml pH 7,0 auf die Säule.

Das gebundene Ovomucoid wurde anschließend mit N-Acetylglucosamin, 100 mg/ml, eluiert.

Die quantitative Bestimmung des Ovomucoids erfolgte photometrisch bei 280 nm unter Verwendung einer Eichkurve.

Der Test zeigte, daß die WGL-Sepharose 6MB 1,5 mg/ml Ovomucoid binden konnte.

Regeneration

Unter der Voraussetzung, daß das verwendete Protein nicht verunreinigt war, ließ sich die WGL-Sepharose nach erfolgter Regeneration wiederholt verwenden. Dazu wurde die Säule mit dem 10-fachen ihres Inhaltes mit folgenden Puffern gewaschen:

Tris-HCl, 0,1 mol/l + NaCl, 0,5 mol/l pH 8,5

anschließend mit

Na-acetat, 0,1 mol/l + NaCl, 0,5 mol/l pH 4,5

Danach wurde mit dem im Versuch verwendeten Startpuffer Tris-HCl, 50 mmol/l + KCl, 100 mmol/l, pH 7,4, reäquilibriert. Bei längerer Aufbewahrung wurde als Konservierungsmittel Merthiolat^{R} (Thimerosal) zugefügt.

Durchführung: Für den eigentlichen Trennvorgang wurde eine Chromatographiesäule mit 5 ml WGL-Sepharose 6MB gefüllt. Dann wurde der Ablauf geöffnet und die Säule mehrfach mit einem Puffer gewaschen, der KCl, 100 mmol/l, Tris-HCl, 50 mmol/l, NaN_3, 3 mmol/l, pH 7,5, enthielt. Nun wurden 4 ml der Membransuspension, Konzentration ca. 1 mg/ml mit dem Säuleninhalt vermischt und für 20 Minuten bei 25° C inkubiert (s. Sarkolemma-Präparation modifiziert nach St. Louis et al.).

Die folgende Elution wurde bei 4° C und einer Ablaufgeschwindigkeit von ca. 4 ml/h vorgenommen. Um nun auch die zurückgehaltenen Vesikel eluieren zu können, wurde die Säule mit 4 ml Puffer beschickt, der KCl,

100 mmol/l, Tris-HCl, 50 mmol/l, NaN_3, 3 mmol/l, pH 7,5, und zusätzlich 100 mg/ml des kompetetiven Zuckers N-Acetyl-Glucosamin enthielt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 25° C konnten die gebundenen Vesikel bei 4° C mit einer Abflußgeschwindigkeit von ca. 6 ml/h zurückgewonnen werden.

3.8 Verwendete Substanzen

Acrylamid: BDH Chemicals Ltd.

ATP, Dinatriumsalz, NADPH: Boehringer Mannheim

2-Aethoxyäthanol, Natriumpyrosulfit: Fluka

Liquid scintillator Unisolve 1: Koch Light Laboratories Ltd.

Ammoniumheptamolybdat, Äthylenglykolmonoäthyläther EGTA, KCl, K-oxalat, Lithiumbromid, Ouabain, Natriumdisulfid, Phenolreagenz, Saccharose, Tris-HCl: Merck AG, Darmstadt

Fixanal Calcium: Riedel-De Haen AG

Antimycin A, Carboanhydrase, Cytochrom-c, NNN'N'-Tetramethyläthyldiamin, 2-Mercaptoäthanol, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Serva Blau-R, Transferrin, γ-Globulin: Serva, Feinbiochemica Heidelberg

Ovomucoid, Thimerosal, Dithiothreitol (DTT): Sigma, München

$[^{45}CaCl_2]$, 3 mCi, $[^3H]$- Ouabain, 1 mCi: New England Nuclear Corporation

3 μCi $[^{45}Ca^{2+}]$/Ansatz ; 2 μCi $[^3H]$/Ansatz

3.9 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen wurden auf dem Tischrechner Wang 600-12TP oder dem Taschenrechner Texas-Instruments Ti 51 A ausgeführt.

Die Ergebnisse sind ausgedrückt als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, d.h. als Mittelwert mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes $N \geq 3$. Innerhalb eines Versuches wurde jede Meßgröße mindestens doppelt bestimmt, $N \geq 2$, und als Versuchsergebnis jeweils das Mittel der Einzelbestimmung festgelegt.

N = Zahl der Versuche

n = Zahl der Einzelbestimmungen

$\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel

$s_{\bar{x}}$ = Mittlerer Fehler des arithmetischen Mittels

4. Ergebnisse

4.1 Methodischer Teil

4.1.1 Vergleich der einzelnen Präparationen:

Um funktionsfähige und mit möglichst geringen Verunreinigungen behaftete Vesikel zu erhalten, wurden drei verschiedene Präparationen vergleichend durchgefürt.

a) Präparation nach Levitsky et al., teilweise modifiziert nach Wollenberger et al. (19,52).
Theoretisch konnte man hier eine besondere Reinheit der Partikel auf Grund der guten Trennung im Dichtegradienten erwarten.
Die Präparation von Levitsky - Wollenberger, ursprünglich aus tiefgefrorenen Taubenherzen durchgefürt, ging von der Idee aus, eine partielle Ca^{2+}-Beladung der Mikrosomen vorzunehmen, um ihre Dichte künstlich zu erhöhen. In der folgenden Dichtezentrifugation sollten die Vesikel des Sakoplasmatischen Retikulums deshalb also bei hoher Dichte, die Vesikel des SL bei wesentlich niedriger Dichte zu finden sein.
Die Technik der Beladung der Vesikel ließ sich jedoch nicht nachvollziehen. Auch in dem von Levitsky angegebenen Medium konnte keine Anreicherung von $[^{45}Ca^{2+}]$ nachgewiesen werden.

b) Daher wurde als zweites die Präparation von Schapira versucht, die dieser am Skelettmuskel durchgefürt hatte.

Die Präparation von Schapira et al. beruht auf der Extraktion mit LiBr, im weiteren Verlauf auch mit KCl. Nach jeweiliger Salzbehandlung und Zentrifugation der Proteinsuspension wurde der Überstand weiter verarbeitet. Naturgemäß ergab sich deshalb nur eine geringe Ausbeute an Protein, das auf den Dichtegradienten gegeben werden konnte. Die Zentrifugation im vierstufigen Gradienten ergab vier Banden. Nach Schapira sollte die Sarkolemma-Fraktion in der 8,5% - 30%igen Saccharose zu finden sein.
Es zeigte sich jedoch, daß sich die als Markerenzym verwendete Na^+,K^+-ATPase gleichmäßig und mit geringer Aktivität in allen Banden nachweisen ließ.

c) Da sich auch diese Methode als unbrauchbar erwiesen hatte, wurde die Präparation nach St. Louis und Sulakhe durchgeführt (44).
Die Präparation erfolgte durch Behandlung des Homogenats mit KCl und anschließender zweifacher Dichtegradientenzentrifugation. Da die Dichtegradientenzentrifugation mit zwei verschiedenen diskontinuierlichen Gradienten durchgeführt wurde, ließ sich eine hohe Reinigung des Sarkolemmas erwarten.
Tatsächlich zeigte die Fraktion F3C eine eindeutige Anreicherung mit Na^+,K^+-ATPase.

4.1.2 Aufgrund der Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase,

der NADPH-Cytochrom-C-Reduktase und der Ca^{2+}-ATPase ließ sich eine wesentliche Kontamination mit anderen Zellbestandteilen ausschließen.

Da sich die Methoden der Ca^{2+}-Beladung der Vesikel (Levitsky) und auch der Extraktion mit LiBr (Schapira) als unbrauchbar erwiesen hatten, wurde in dieser Arbeit zur Isolierung von Sarkolemma-Membranen die Präparation von St. Louis und Sulakhe verwendet.

4.2 Experimenteller Teil

4.2.1 Charakteristische Untersuchungsbefunde:

a) Proteinausbeute

Ausgehend von einem mittleren Gewicht der Kaninchenherzen von 5,5 g ± 0,5 g , n=6 ,ergaben sich folgende Proteinausbeuten für die einzelnen Fraktionen:

Fraktion	mg Prot.
F3A	4,0 ± 0,5
F3B	8,5 ± 0,9
F3C	10,6 ± 1,0
F3D	10,7 ± 1,1

b) Haltbarkeit

Schon die Aufbewahrung der Plasmalemmavesikel über einen Tag im Kühlschrank führte zu einem Aktivitätsverlust der Na^+,K^+-ATPase von ca. [illegible].

Auch die Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel war nach 24 Std. kaum noch meßbar (10).

Die Lagerung der Vesikel in 10%iger Saccharose mit T-D Puffer erbrachte kein besseres Resultat.

Trotz Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff ergab sich bei der anschließenden viertägigen Lagerung bei -20° C ein starker Aktivitätsrückgang der Na^{+},K^{+}-ATPase, der mit einem Verlust der Fähigkeit zur Ca^{2+}-Aufnahme einherging. Aus diesem Grunde war es notwendig, jeden Versuch mit frisch extrahierten Vesikeln vorzunehmen.

c) Daten zu der mit WGL-Sepharose gefüllten Säule (9)

Es zeigte sich, daß es sinnvoll ist, die mit 5 ml WGL-Sepharose gefüllte Säule nicht zu überladen (max. Ovomucoidbindung 1,5 mg/ml). Nur dann ließ sich gleichzeitig eine maximale Sättigung der Liganden (Lectine) sowie auch eine zu starke Verunreinigung der Säule verhindern.

Nach der Trennung der gemischten Vesikel (1 mg/ml) auf der Säule ergab sich folgendes Bild:

Gesamtausbeute 70%, davon "Inside-out" 40% und "Right-side-out" Vesikel 60%.

Dies entspricht in etwa der Annahme, daß die isolierten Membranen zur einen Hälfte aus "Inside-out" und zur anderen Hälfte aus "Right-side-out" Vesikeln bestehen (26).

4.2.2 Enzymaktivitäten, Ouabain-Bindungsstudie und Michaelis-Menten-Kinetik

Wie St. Louis und Sulakhe bereits zeigten, konnte man nach kurzer Behandlung des Homogenats mit KCl eine größere Menge des Proteins mit Na^+,K^+-ATPase Aktivität in der Fraktion F3C auffinden.

Die Enzymaktivitäten, die in den durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Fraktionenen gefunden wurden, sind in den Abbildungen 6-11 und Tabelle 1 dargestellt.

Wie man sieht, ließ sich eine Anreicherung des Proteins mit hoher Na^+,K^+-ATPase-Aktivität durch zweimalige Dichtegradientenzentrifugation in der Fraktion F3C (Saccharose 52,5%-55%) nachweisen. Die Ouabain-Bindungsstudie zeigte ebenfalls eine Anreicherung von [^{3}H]-markiertem Ouabain in der Fraktion F3C.

Im Unterschied dazu war die Aktivität der Cytochrom-c-oxidase, der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und der Ca^{2+}-ATPase in dieser Fraktion am geringsten.

Eine nennenswerte mitochondriale Verunreinigung ließ sich ebenfalls durch eine Atmungmessung ausschliessen.

Durch Messung der Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel bei vier unterschiedlichen Ca-Konzentrationen (s. 3.6) und doppelt reziproke Darstellung im Koordinatensystem ließen sich die kinetischen Daten ablesen,

	Cytochrom C Oxidase nMol/mg/5min	$NADPH_2$ Cyt.C Reduktase nMol/mg/10min	Na^+,K^+ ATP ase µMol P/mg/h	Ca^{2+} ATP ase uMol P/mg/h	Ouabain Bindung pMol/mg	Atmung nMol O_2 / mg x min
F 1	39,8 ± 1,6	3,4 ± 0,2	---	9,2 ± 0,7	0,2 ± 0,05	6,6 ± 0,6
F 2	31,3 ± 1,9	3,4 ± 0,4	1,9 ± 0,4	6,5 ± 0,7	1,2 ± 0,2	5,8 ± 0,2
F 3	8,6 ± 0,9	2,1 ± 0,3	4,2 ± 0,5	5,8 ± 0,7	2,1 ± 0,3	4,8 ± 0,4
F 4	9,4 ± 0,8	2,2 ± 0,3	3,1 ± 0,5	2,6 ± 0,6	1,9 ± 0,3	4,8 ± 0,4
F 3A	8,8 ± 0,8	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,4	4,4 ± 0,8	1,0 ± 0,2	4,7 ± 0,5
F 3B	7,9 ± 0,9	2,5 ± 0,3	1,5 ± 0,4	4,6 ± 0,9	2,0 ± 0,3	5,0 ± 0,5
F 3C	5,9 ± 0,6	1,8 ± 0,2	3,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	3,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2
F 3D	3,1 ± 0,6	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,4	2,1 ± 0,4	2,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2

Tabelle 1 : Zusammenfassung der Ergebnisse

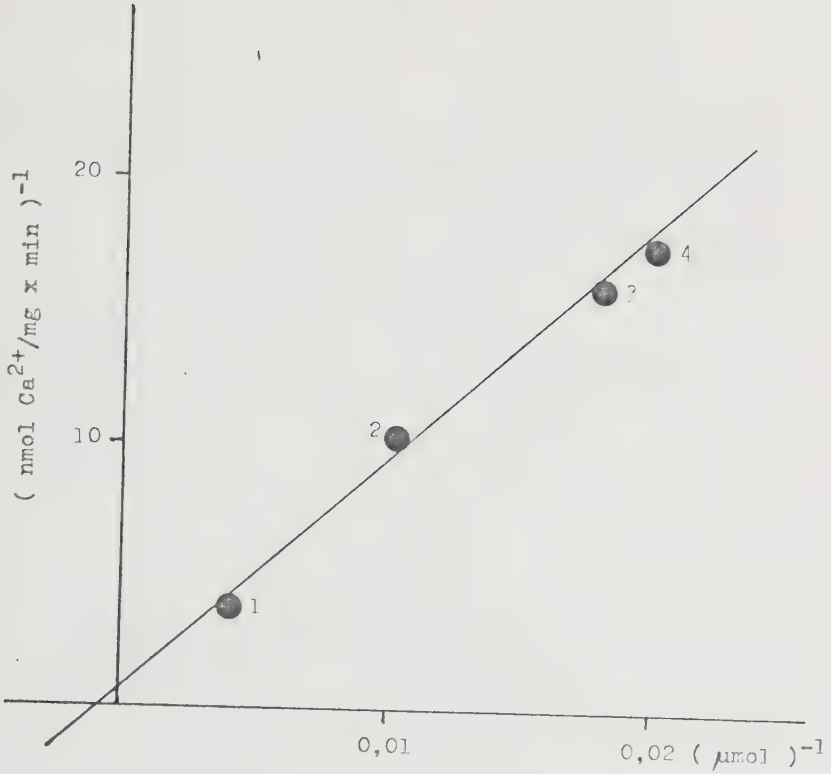


Abb. 5 : Michaelis-Menten-Kinetik

Km : 1,83 µmol/l
Vmax : 2,06 nmol/mg x min

$CaCl_2$ 1 : 250 µmol/l
2 : 100 µmol/l
3 : 60 µmol/l
4 : 50 µmol/l

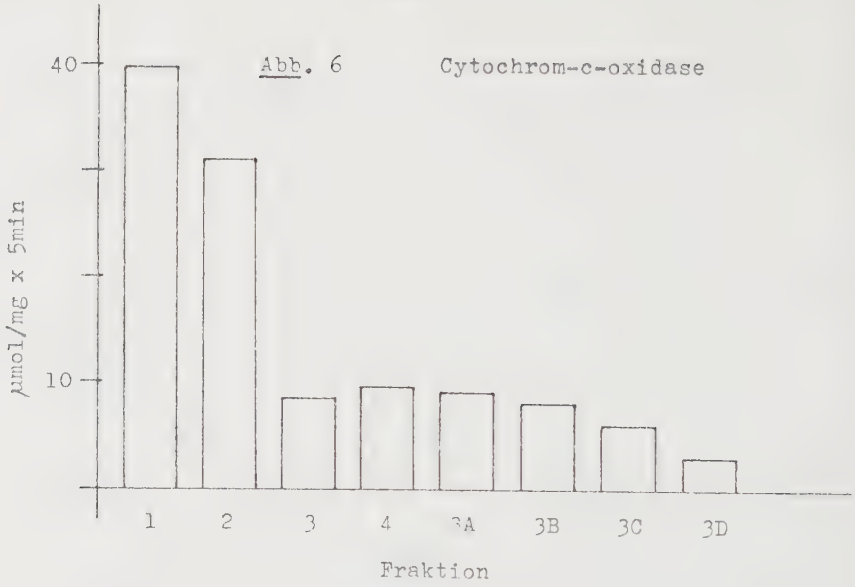


Abb. 6 Cytochrom-c-oxidase

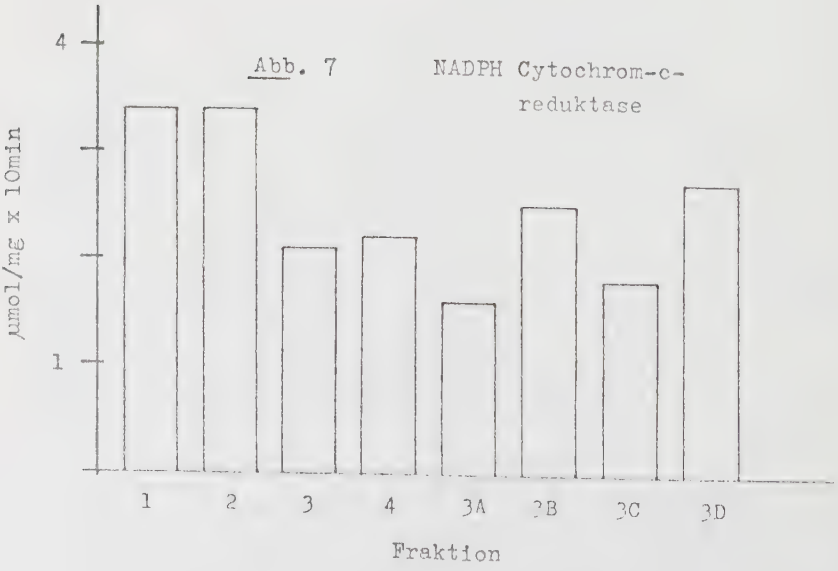


Abb. 7 NADPH Cytochrom-c-reduktase

Abb. 8 Na^+,K^+-ATPase

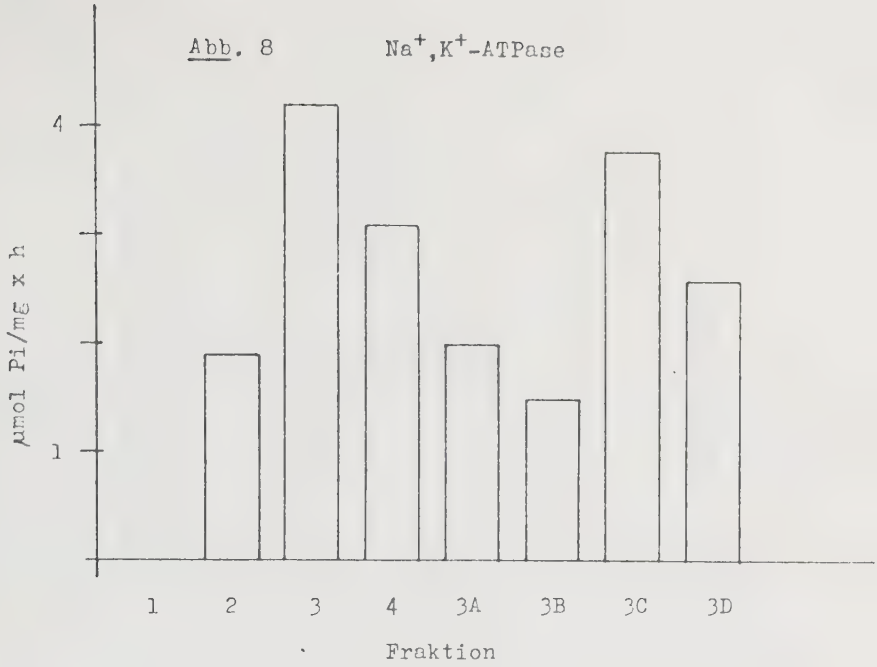


Abb. 9 Ca^{2+}-ATPase

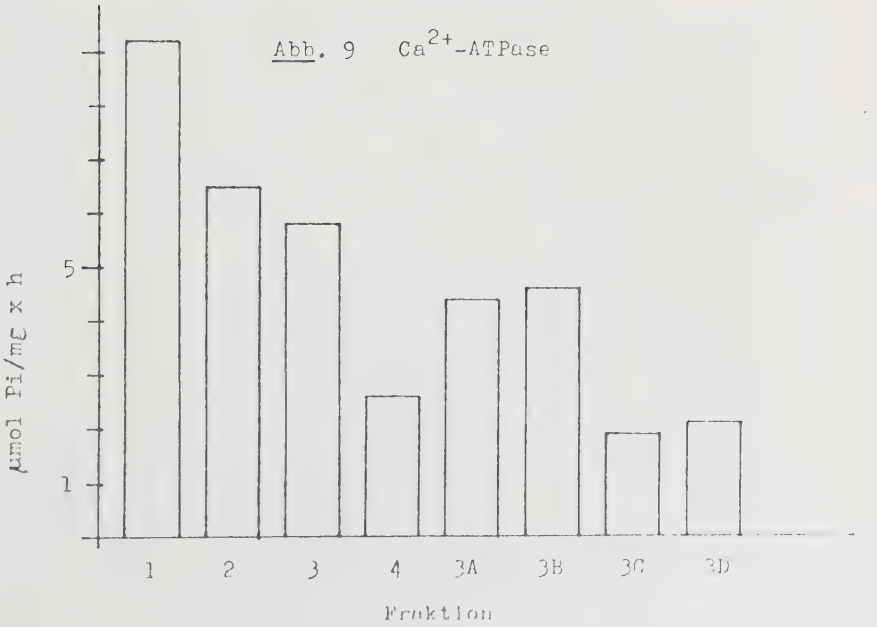


Abb. 10 Ouabain-Bindungsstudie

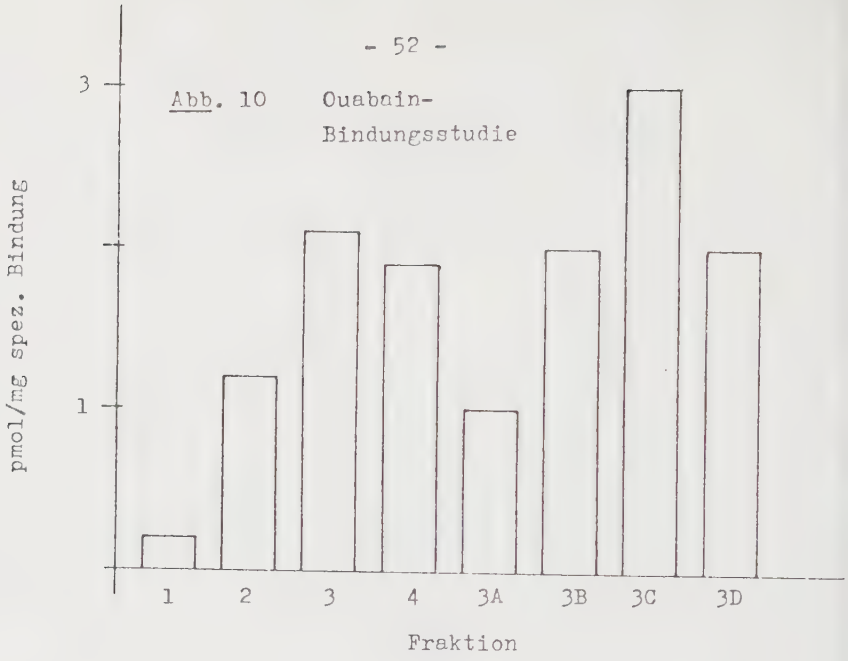
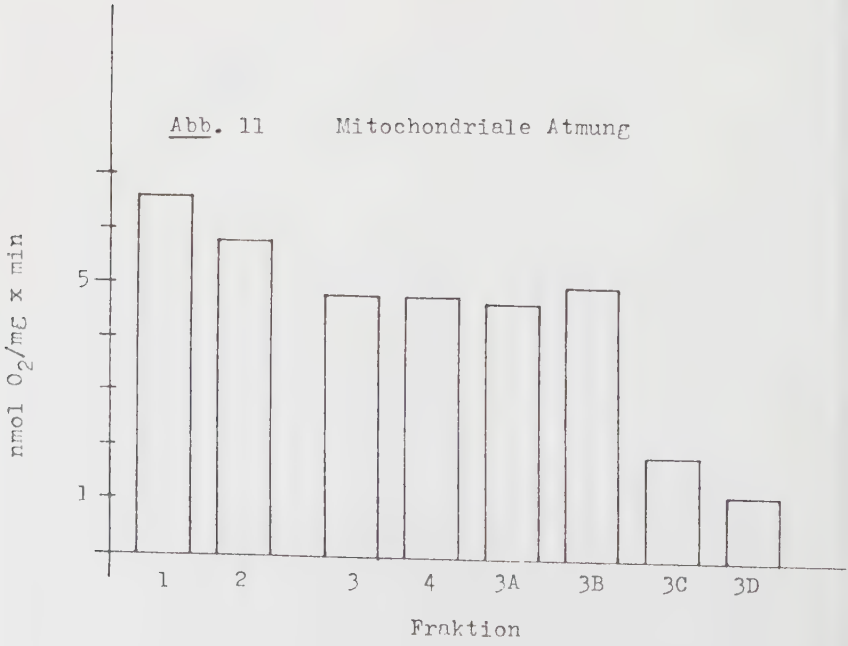


Abb. 11 Mitochondriale Atmung



bzw. errechnen. (s. Abb. 5)
Aus dem Schnittpunkt der erhaltenen Geraden mit der x - und der y - Achse ergab sich ein Km-Wert von 1,83 µmol und ein Vmax von 2,06 nmol/mg x min.

4.2.3 Ca^{2+}-Aufnahme der Vesikel

Die Fähigkeit von Plasmamembranvesikeln zur aktiven und passiven Ca^{2+}-Aufnahme ist bereits von zahlreichen Autoren beschrieben worden (10,12,23,25,44,45,46).

Die passive Ca^{2+}-Aufnahme war stets zu Beginn der Inkubation , d.h. nach spätestes 1-2 Minuten abgeschlossen.Da der aktive Ca^{2+}-Transport von der Innenseite der Membran zur Außenseite stattfindet,wurde eine Steigerung der Ca^{2+}-Aufnahme bei den Versuchen mit "Inside-out" Vesikeln erwartet.
Sämtliche Messungen der Ca^{2+}-Aufnahme wurden in Gegenwart von K-Oxalat durchgeführt,da die Ca^{2+}-Aufnahme Versuche von Mas-Oliva und Nayler (25,26) zeigten,daß die Ca^{2+}-Aufnahme ohne Oxalat bereits nach 1 Minute beendet war.Ein Zusatz von Oxalat erlaubte es dagegen, die Reaktion einen längeren Zeitraum verfolgen zu können. Einen typischen Verlauf zeigt Abbildung 13.
Eine Charakterisierung des als Ca^{2+}-Pumpe fungierenden Transportsystems konnte mit Hilfe von vier verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen vorgenommen werden (s. 3.6 und 4.2.2, sowie Abb. 5).

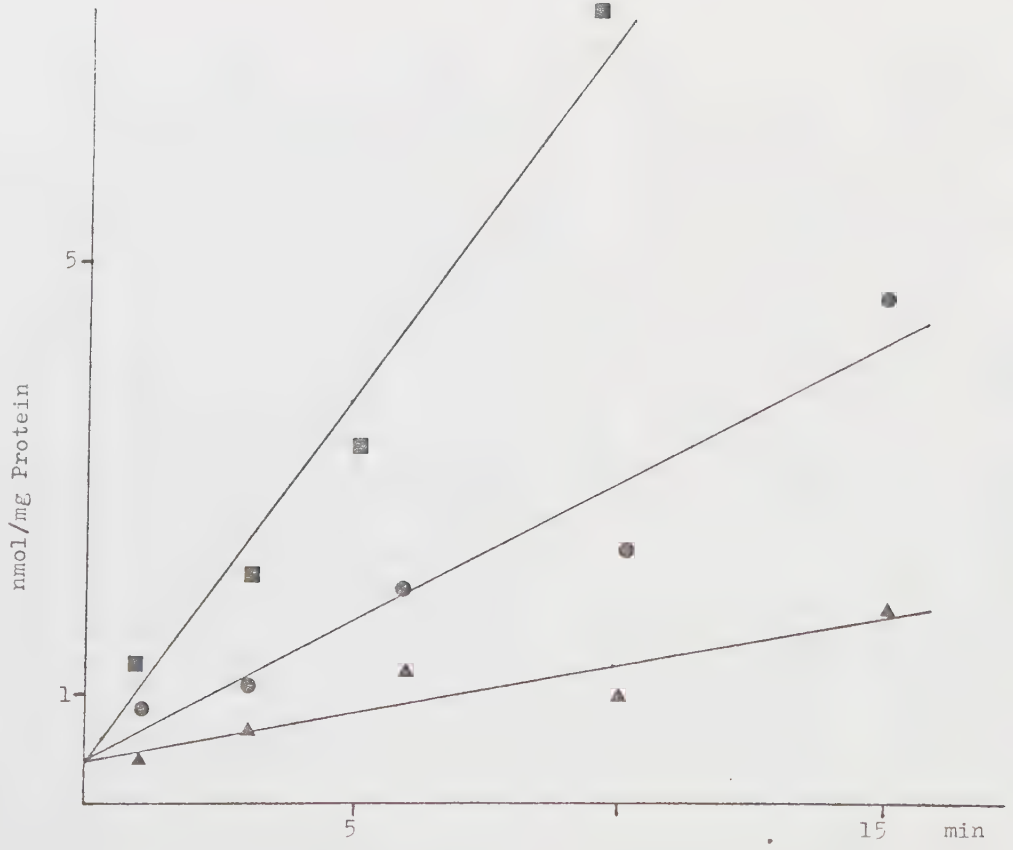


Abb. 12 : Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel.Vergleich zwischen

■ :"Inside-out" ● : gemischte Frak. ▲ :"Right-side-out

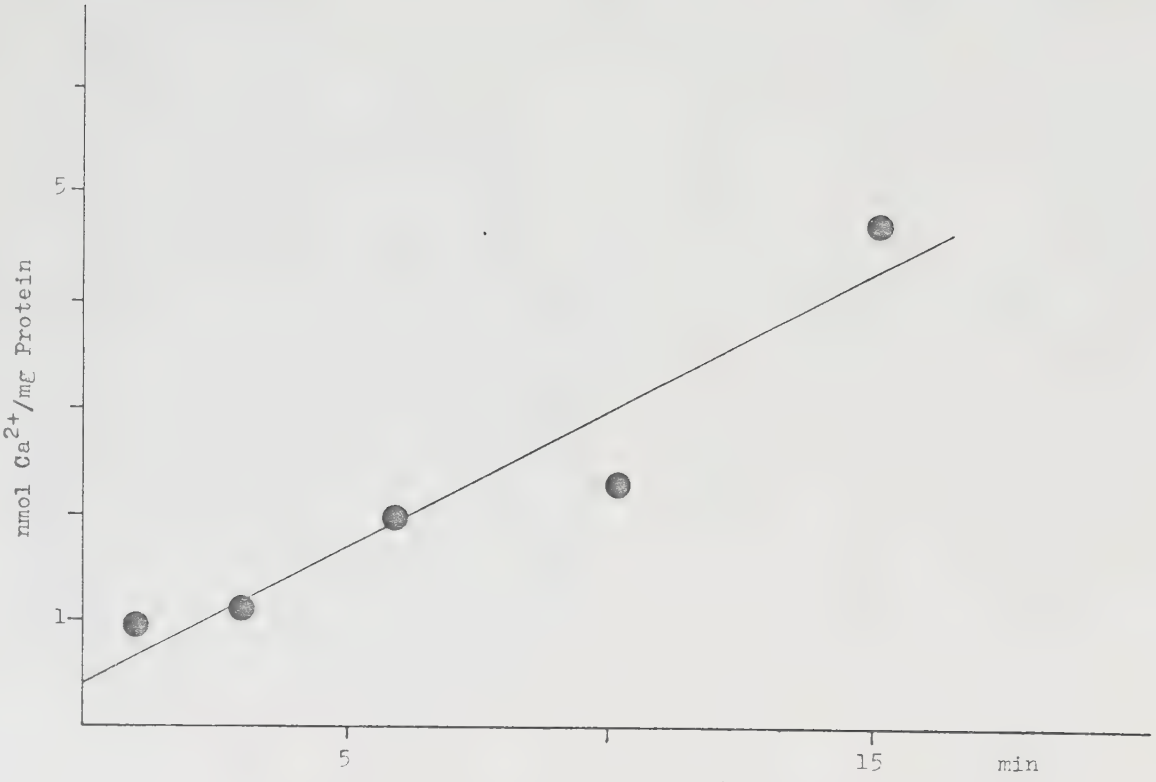


Abb. 13 : Typischer Verlauf der Ca^{2+}-Aunahme in die Vesikel

Nach Trennung der Vesikel in "Inside-out" und "Right-side-out" ließ sich bestätigen, daß die Fähigkeit zur Ca^{2+}-Aufnahme eine Eigenschaft der "Inside-out" Vesikel ist. Während die "Inside-out"-Fraktion etwa die doppelte Akkumulationsfähigkeit der gemischten Fraktion aufwies, zeigte die "Right-side-out"-Fraktion keine nennenswerte Aktivität.
Demnach ist die "Inside-out"-Fraktion für die aktive und passive Aufnahme, die "Right-side-out"-Fraktion allein für die passive Ca^{2+}-Bindung verantwortlich (s. Abb. 12).
Es zeigte sich daher, daß für die Mehrzahl der Versuche zur ATP-abhängigen Ca^{2+}-Aufnahme eine aufwendige Trennung der Vesikel nicht erforderlich war.

4.2.4 Einfluß verschiedener Pharmaka auf den aktiven Transport von Ca^{2+}-ionen.

Für diese Versuche wurden ausschließlich ungetrennte Plasmamembranvesikel verwendet (Begründung s. 4.2.3)

a) Ca^{2+}-Aufnahme in Gegenwart von Ouabain und Verapamil.
Die aktive Aufnahme von $[^{45}Ca^{2+}]$ wurde in Gegenwart von Ouabain, 1,5 µmol/l, gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Ouabain zeigte sich keine Abnahme des aktiven Ca^{2+}-Transportes in die Vesikel. Auch die Inkubation in Gegenwart von Verapamil, 10 µmol/l, ergab keine Veränderung des Ca^{2+}-Aufnahmeprozesses.

b) Ca^{2+}-Aufnahme in Gegenwart von Propranolol, 0,5 mmol/l.

Im Vergleich zur Kontrolle nahm die Ca^{2+}-Aufnahme der Vesikel um etwa 50% ab.

Die Wirkung des Propranolols erfolgt hier nicht über die Blockade spezifischer adrenerger ß-Rezeptoren, sondern geht auf die unspezifische Membranwirkung zurück.

c) Ca^{2+}-Aufnahme in Gegenwart verschiedener Na^{+}-Konzentrationen.

Da eine Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme bei isolierten Erythrocytenmembranen bereits beschrieben wurde, (31) versuchten wir auch eine Hemmung am Sarkolemma nachzuweisen.

Wie Abb. 15 zeigt, konnte eine von der NaCl-Konzentration abhängige Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme nachgewiesen werden.

Dabei ergab sich zwischen der verwendeten NaCl-Konzentration und der gemessenen Ca^{2+}-Aufnahme keine lineare Abhängigkeit.

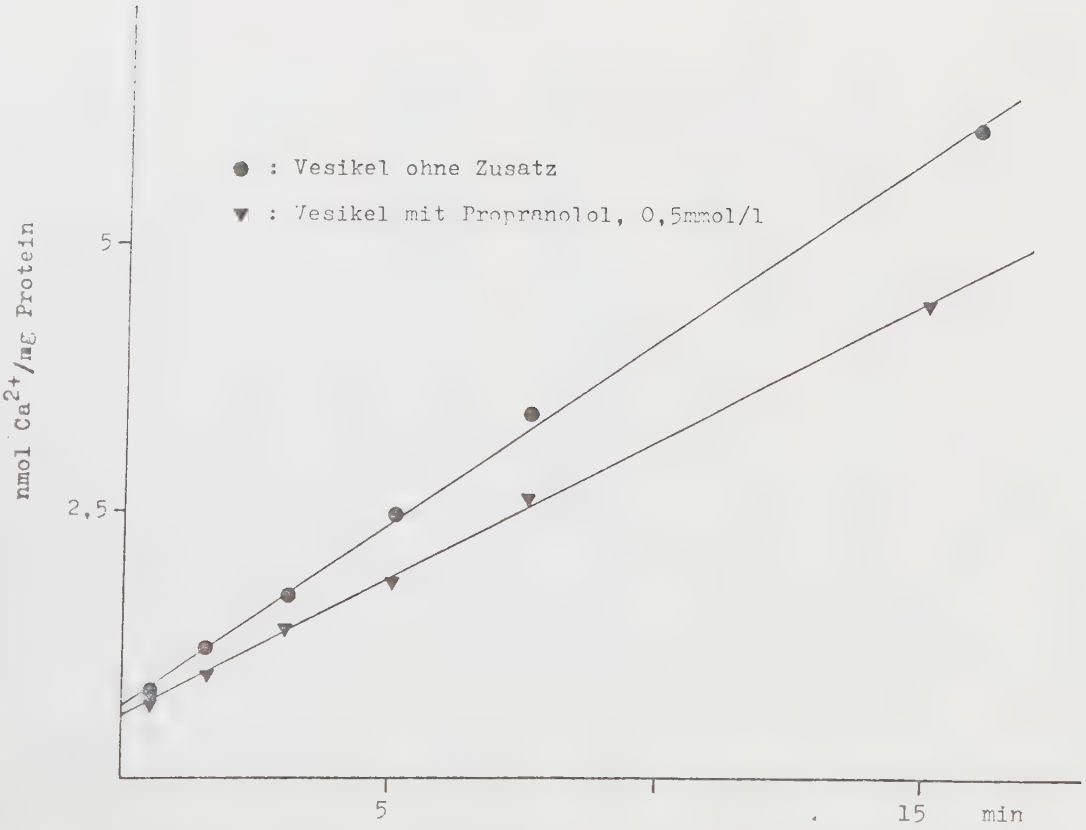


Abb. 14 : Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme durch Propranolol

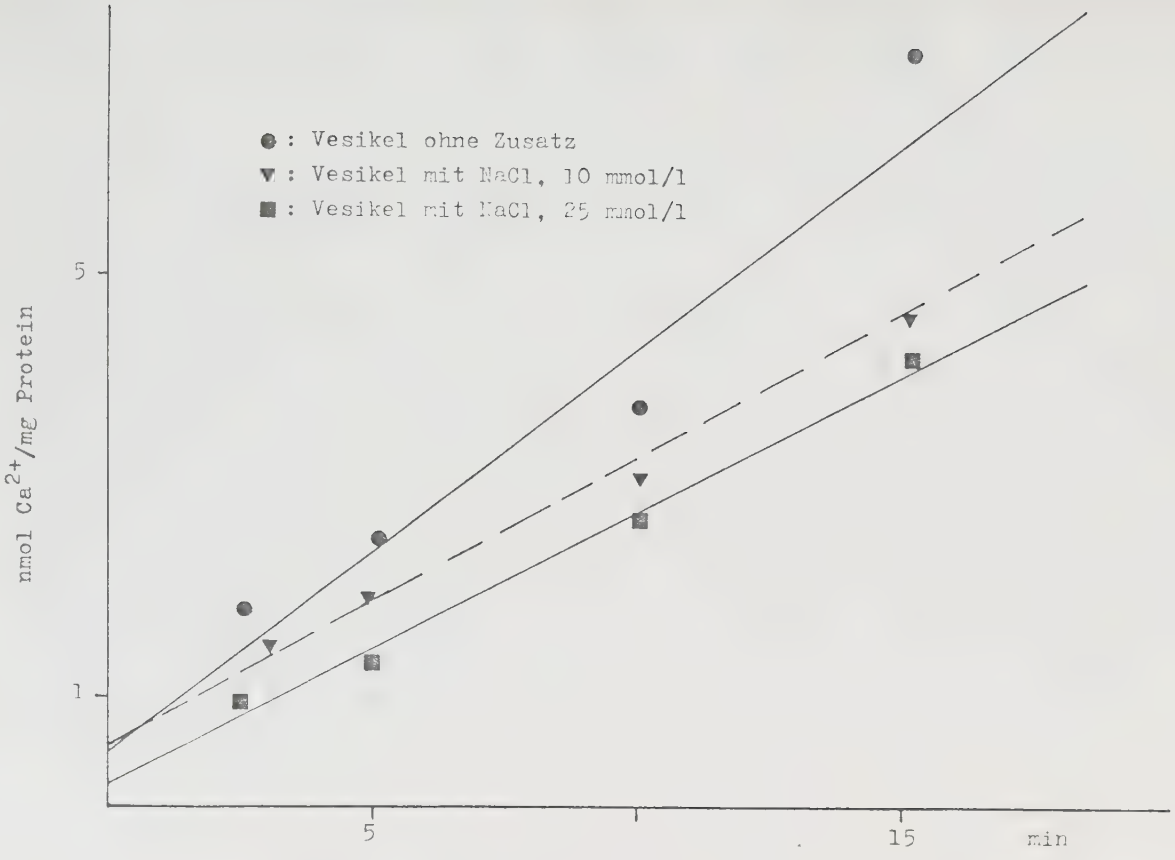


Abb. 15 : Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme durch NaCl

5. Diskussion

Die elektonenmikroskopische Aufnahme der isolierten Sarkolemma-Fraktion zeigt in der Mehrzahl vesikuläre Strukturen. Wie bereits vorher gezeigt, können "Inside-out" oder "Right-side-out" Vesikel vorliegen.
Die ausgeprägte [^{3}H]-Ouabain-Bindung dieser Fraktion (53) ist ein weiterer Hinweis auf eine mit Plasmalemma angereicherte Fraktion (s. Abb. 10). [^{3}H]-Ouabain ist, wie andere Autoren berichtet haben, ein Hemmer der zellmembranständigen Na^+,K^+-ATPase, einem Leitenzym des Plasmalemmas.
Die Messung der Na^+,K^+-ATPase (s. ABB. 8) bestätigt die Ergebnisse der Ouabain-Bindungsstudie.
Die übrigen Enzyme, die im Verlauf der Präparation in den verschiedenen Fraktionen bestimmt wurden (s. Abb. 6,7,9), sowie die Ergebnisse der Atmungsmessung (s. Abb. 11) sind ein eindeutiger Hinweis darauf, daß die Reinigung und Anreicherung des Homogenats mit Plasmalemma bishin zur Fraktion F3C erfolgreich war.
Die gereinigte Sarkolemma-Fraktion wurde elektrophoretisch weiter untersucht und dabei gleichzeitig eine Molekulargewichtsbestimmung der beiden am stärksten gefärbten Banden vorgenommen. Sie bestanden aus zwei Proteinen mit einem Molkulargewicht von 107.000 Dalton bzw. 55.000 Dalton.
Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei St. Louis und Sulakhe, wie auch bei anderen Autoren (13,14,41,42).

Das Protein mit 107.000 Dalton dürfte demnach der α-Kette und das Protein mit 55.000 Dalton der β-Kette der Na^+,K^+-ATPase entsprechen (Jorgensen 1974, Skou 1976, 13,14,42). Die Struktur des aktiven Enzyms wurde 1975 von Kyte (18) als α_2, β_2 mit einem Molekulargewicht von 260.000 Dalton beschrieben.
Die Gesamtheit der biochemischen Untersuchungsergebnisse weist also darauf hin, daß wir es bei der Fraktion F3C mit Vesikeln von hoch gereinigtem Sarkolemma zu tun haben.
Im Vergleich dazu ergab die Präparation von Levitsky und Wollenberger (19,52) zu wenig Ausbeute an Protein, um die Trennung der Fraktionen durch Ca^{2+}-Beladung durchführen zu können. Auch methodisch bieten die schon teilweise vorgeladenen Vesikel für die anschließend vorgesehenen Ca^{2+}-Aufnahme-Experimente ungeeignete Voraussetzungen.
Die Präparation nach Schapira (40) wurde ursprünglich am Skelettmuskel durchgeführt. Die Extraktion der Vesikel mit LiBr und KCl führte jedoch in unseren Experimenten am Herzmuskel dazu, daß sich in keiner Fraktion eine Anreicherung von Na^+,K^+-ATPase nachweisen ließ. Möglicherweise beruht dies auf einer Schädigung des Enzyms, denn Katz (15) und St. Louis und Sulakhe (44) erwähnen ebenfalls in ihren Versuchen, daß LiBr einen schädlichen Einfluß auf die Na^+,K^+-ATPase der Herzmikrosomen ausübt.

Aufgrund unserer vergleichenden Untersuchungen eignet sich die Methode nach St. Louis und Sulakhe mit Leichter Modifikation am besten für die Gewinnung weitgehend reiner Sarkolemma-Präparationen.Die dabei angewendete Extraktion der Vesikel mit KCl und zweimaliger Dichtegradientenzentrifugation führte zur Isolierung von Vesikeln,deren einziger Nachteil darin bestand,daß die Ca^{2+}-ATPase rasch an Aktivität verlor.Die Versuche mußten daher stets mit frisch präparierten Vesikeln vorgenommen werden.

Der Vollständigkeit halber muß erwähnt werden,daß in letzter Zeit von einigen Autoren (V. Kliem, J. Preuner, 17) Vesikelpräparationen angegeben werden,bei denen lediglich die Schritte der Homogenisation und Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt werden.Nach unserer Erfahrung weisen diese Präparationen aber sowohl hinsichtlich der Anordnung der Vesikel im Dichtegradienten,als auch in der Reinheit der Fraktionen erhebliche Mängel auf.

Die nach der Methode von St. Louis und Sulakhe isolierten Vesikel liegen zu 50% als "Inside-out" und zu 50% als "Right-side-out" vor (43,46).

Dieses Ergebnis ließ sich statistisch gesehen erwarten und auch durch $[^3H]$ -Ouabain-Bindungsstudien bestätigen.Die "Inside-out" Vesikel sind dadurch gekennzeichnet,daß sie die Fähigkeit zum Ca^{2+}-Transport und eine

Ca^{2+}-ATPase besitzen,weil die dazu erforderlichen Strukturen vom Inkubationsmedium her zugänglich sind. Auf der Oberfläche der "Right-side-out" Vesikel,die der ursprünglichen Zellmembranoberfläche entspricht, befinden sich dagegen die spezifischen Bindungsstellen für die herzwirksamen Glykoside,die Na^+,K^+-ATPase. Die Zelloberfläche ist ebenfalls gekennzeichnet durch die Glykokalix und ihre Fähigkeit, mit Hilfe der N-Acetyl-Neuraminsäure Ca^{2+}-ionen passiv zu binden (11,25,26).

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie lassen sich "Inside-out" und "Right-side-out" Vesikel voneinander trennen.Nur durch diese Methode war es möglich nachzuweisen,daß die ATP-abhängige Ca^{2+}-Aufnahme alleine durch die "Inside-out" Vesikel getragen wird (Mas-Oliva und Nayler, 1979).

Da die Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel innerhalb von Sekunden zum Stillstand kommt (25,26), ist es ähnlich wie bei Untersuchungen am SR erforderlich,dem Inkubationsmedium Oxalat zuzugeben,damit das aufgenommene Ca^{2+} intravesikulär zu unlöslichem Ca-Oxalat abgebunden wird (48).Die Aufnahme kann dann über einen längeren Zeitraum verfolgt werden.

Zur pharmakologischen Beeinflussung der Ca^{2+}-Auf[illegible] wurden in der Regel gemischte Fraktionen der Vesikel verwendet,um die zeitaufwendige säulenchromatographische Trennung, mit der zugleich ein relativer Aktivitätsver-

lust eingehandelt wird, zu umgehen.

Die beiden Agentien,mit denen sich der ATP-getriebene Ca^{2+}-Transport in die Vesikel erfolgreich hemmen ließ, waren Propranolol und Na^{+}-ionen.Propranolol wirkte allerdings nur in einer unphysiologisch hohen Dosierung, so daß man diese Hemmwirkung auf die bekannte unspezifische Membranwirkung des β-Blockers zurückführen muß. Eine vergleichbare Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme,die ohne Blockierung der Ca^{2+}-ATPase abläuft,ist bereits für das SR beschrieben worden (29,34,35,37,43).

Eine Na^{+}-Konzentration von 50 mmol/l halbiert die Geschwindigkeit der Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel.Dabei liegt aber,wenn die Effekte ansteigender Na^{+}-Konzentrationen zugrunde gelegt werden, dem Hemmechanismus keine Linearität zugrunde. Es läßt sich eher eine logarithmische Abhängigkeit in bezug auf die Na^{+}-Konzentration erkennen. Diese Ergebnisse finden eine Parallele bei den Untersuchungsbefunden zum aktiven Ca^{2+}-Transport an Mitochondrien (33,34).

Es ist daher anzunehmen,daß eine physiologisch oder pharmakologisch bedingte Erhöhung der Na^{+}-Konzentration intrazellulär zu einer Hemmung der Ca^{2+}-ATPase des Plasmalemmas, bzw. des Ca^{2+}-Auswärtstransportes führt. Wenn man davon ausgeht,daß Ouabain die Na^{+},K^{+}-ATPase hemmt,so kann die dadurch bedingte Erhöhung der intrazellulären Na^{+}-Konzentration über eine Hemm-

ung der Ca^{2+}-ATPase und des Ca^{2+}/Na^{+}-carrier-Systems zur Ca^{2+}-ionen-Konzentrationserhöhung im Cytoplasma beitragen, die mit einer Steigerung der Kontraktionskraft einhergeht. Bei entsprechend hohen, d.h. toxischen Dosen von Ouabain würde dies zu einer Ca^{2+}-Überladung der Zelle mit einer konsekutiven Erhöhung des Gesamtcalciumgehaltes führen, wie dies beispielsweise von Nayler und Noack 1981 (29) beschrieben worden ist. einen direkten Einfluß von Ouabain auf die sarkolemmale Ca^{2+}-Pumpe konnten wir in unseren Präparationen ausschließen. Im Gegensatz dazu konnten Spitzer et al. (1981) die direkte Hemmbarkeit der Ca^{2+}-ATPase durch Ouabain in Abwesenheit von Na^{+}-ionen zeigen. In diesen Untersuchungen wurde als Energielieferant nicht das Na_2ATP, sondern die ATP-regenerierenden Systeme Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase, sowie Kreatininphosphat und Kreatininphosphokinase verwendet. Darüber hinaus wurde Ouabain (0,3 mmol/l) während der Homogenisation zugegeben. Es konnte auf diese Weise in die Vesikel gelangen, d.h. an der Innenseite der "Inside-out" Vesikel angreifen. Allerdings bleibt die Frage offen, in wieweit die beobachtete Verringerung der Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel tatsächlich die direkte Hemmwirkung des Ouabains auf die Ca^{2+}-ATPase widerspiegelt. Nach Nayler und Dunnet (28) ist es nämlich andererseits möglich, daß Ouabain an der Oberfläche des Plasmalemmas zur Umverteilung

von Ca^{2+}-ionen aus Membranbindungsstellen führt (11), und so durch Konzentrationserhöhung des intravesikulären Calciums der Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel entgegenwirkt.

Eine besondere Schwierigkeit, die Existenz einer energieabhängigen Ca^{2+}-Pumpe im Sarkolemma nachzuweisen, lag in der Tatsache begründet, daß die meisten Präparationen, die für diese Untersuchungen verwendet wurden, besonders stark durch andere subzelluläre Fraktionen (Mitochondrien, SR) kontaminiert sind.

Den besonderen Fortschritt dieser Arbeit sehen wir deshalb darin, daß mit einer hochgereinigten Fraktion sarkolemmaler Vesikel gearbeitet werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir wie Caroni und Carafoli (1980, 2) die Existenz eines ATP-abhängigen Ca^{2+}-Transportsystems im Sarkolemma des Herzens nachweisen, das neben dem elektrogenen Ca^{2+}/Na^{+}-carrier-System für die Regulierung des intrazellulären Ca^{2+}-Haushaltes verantwortlich sein könnte. Seine Hemmung infolge regionaler Erhöhung der Na^{+}-Konzentration ist darüber hinaus vielleicht die Ursache für die unter toxischen Glykosidkonzentrationen beobachtete Zunahme des myokardialen Ca^{2+}-Gesamtgehaltes bzw. Blockierung des Ca^{2+}-Effluxes, die letzten Endes zu der typischen glykosidbedingten Kontraktur des Arbeitsmyokards führt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung einer ATP-abhängigen Ca^{2+}-Pumpe in Vesikeln des Sarkolemms aus Kaninchenherzen. Da eine ATP-abhängige Ca^{2+}-Pumpe bereits im SR beschrieben worden ist, war es unser Ziel, eine entsprechende Pumpe im Sarkolemm zu isolieren. Um eine brauchbare Methode zur Isolierung von Plasmamembranvesikeln zu entwickeln, wurden drei unterschiedliche Präparationen durchgeführt. Das Problem bei der Vesikelpräparation bestand darin, die Kontamination mit anderen Zellfragmenten zu vermeiden. Die Reinigung des Ca^{2+}-Transportproteins wurde durch Bestimmung der Leitenzyme der verschiedenen Zellorganellen überwacht. Darüber hinaus wurde eine Ouabain-Bindungsstudie und eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Fraktion F3C durchgeführt.
Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen erwieß sich nur die leicht modifizierte Präparation nach St. Louis und Sulakhe als geeignet, Plasmamembranvesikel aus Kaninchenherzen zu isolieren.
Da die Vesikel typischerweise in zwei Orientierungen, nämlich "Inside-out" und "Right-side-out" vorliegen, nahmen wir eine Trennung mittels Affinitätschromatographie vor. Dabei zeigte es sich, daß der aktive, ATP-abhängige Ca^{2+}-Transport ausschließlich eine Eigenschaft der "Inside-out" Vesikel darstellt.

Die Charakterisierung der Ca^{2+}-Pumpe ergab einen Km-Wert von 1,83 µmol/l und ein Vmax von 2,06 nmol/mg x min.

Bei den pharmakologischen Untersuchungen ließ sich weder durch Ouabain, noch durch Verapamil eine Beeinflussung des Ca^{2+}-Transportes nachweisen. Lediglich Propranolol, in hoher unphysiologischer Dosierung (0,5 mmol/l), und NaCl (10-50 mmol/l) führten zu einer Hemmung der Ca^{2+}-Aufnahme in die Vesikel.

Der Befund, daß NaCl den aktiven, ATP-abhängigen Ca^{2+}-Aufnahmeprozeß wirkungsvoll zu hemmen vermag, läßt Rückschlüsse auf die Wirkungsweise toxischer Digitaliskonzentrationen zu. Demnach würde die intrazelluläre Erhöhung der NaCl-Konzentration als Folge der Hemmwirkung von Ouabain auf die Na^+,K^+-ATPase über eine Hemmung der sarkolemmalen Ca^{2+}-Pumpe zu einer Verminderung des Ca^{2+}-Auswärtstransportes führen.

Auch im therapeutischen Dosisbereich könnte Ouabain auf diese Weise die Kontraktilität des Herzens verbessern, während es bei toxischen Dosen zu einer intrazellulären Ca^{2+}-Überladung der Herzzelle mit meßbarer Erhöhung des Gesamtcalciumgehaltes kommt, die die Herzzelle in eine Dauerkontraktur bringt.

7. [illegible]

(1) [illegible]
[illegible]
Na^+-efflux in squid axon.
Biochim. et Biophys. Acta 551, 220-223

(2) CARONI,P., and CARAFOLI,E., 1980
An ATP-dependent Ca^{2+}-pumping System in dog heart sarcolemma.
Nature Vol. 283, No. 5749, pp. 765-767

(3) CHENG,L.C., ROGUS,E.M., and ZIERLER,K., 1977
Catechol a structure requirement for Na^+,K^+-ATPase stimulation in rat skeletal muscle membrane.
Biochim. et Biophys. Acta 464, 338

(4) COOPERSTEIN,S.J., and Lazarow,A., 1950
A microspectrophotometric method for the determination of cytochrom-c oxidase.
J. Biol. Chem. Vol. 189, 665-670

(5) FISKE,C.H., and SUBBAROW,J., 1925
The colorimetric determination of phosphorus
J. Biol. Chem. Vol. 66, 375-400

(6) HAAKER,H., RACKER,E., 1978
Purification and reconstitution of the Ca^{2+}-ATPase from plasma-membranes of pig erythrocytes.
J. Biol. Chem. Vol. 254, 6598-6602

(7) HEARING,V.J., KLINGER,W.G., EKEL,T.M., and MONTAGNE,P.M., 1976
Molecular weight estimation of Triton X-100 solubilised proteins by polyacrylamide gel electrophoresis.
Analytical Biochemistry 72, 113-122

(8) HEINEN,E., NOACK,E., 1972
Effects of k-strophantin and digitoxigenin on contractile force, calcium content and exchange in guinea-pig isolated atria.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275,359

(9) HELLSTRÖM,U., DILLNER,M.C., HAMARSTRÖM,G.J. 1976
Fractionation of human T-lymphocytes on wheat germ agglutinin-Sepharose.
J. Exp. Med., 144, 1281-1285

(10) HUI,C.W., DRUMMOND,G.J., 1976
Calcium Accumulation in plasma membrane-enriched preparation of myocardium.
Arch. of Biochem. and Biophys. 173, 415-427

(11) JAQUES,C.W., BROWN,E.B., BARRET,J.M., BREY,W.S., and WELTNER,W., 1977
Sialic Acid
J. Biol. Chem. Vol. 252, 4533-4538

(12) JARRET,H.W., and PENNISTON,J.T., 1978
Purification of the Ca-stimulated ATPase activator from human erythrocytes.
J. Biol. Chem. Vol. 253, 4676-4682

(13) JØRGENSEN,P.L., 1974
Purification of Na^+,K^+-ATPase. Active site determinations and criteria of purity.
Biochim. et Biophys. Acta 356, 52-67

(14) JORGENSEN,P.L., 1974a
Purification of Na^+,K^+-ATPase from the outer
Biochim. et Biophys. Acta [illegible]

(15) KATZ,A.M., REPKE,D.J., UHCHAW,J.E.,
and POLASCIK,M.A., 1969
Characterisation of dog cardiac microsomes.
Use of zonal centrifugation to fractionate
fragmented sarcoplasmatic reticulum. Na^+,K^+-
ATPase and mitochondrial fragments.
Biochim. et Biophys. Acta 205, 473-490

(16) KLEE,C.B., CRONCH,T.H., and RICHMAN,P.G., 1980
Calmodulin
Ann. Rev. Biochem. 49, 489-515

(17) KLIEM,V., PREUNER,J., 1980
Inhibition of an active calcium transport
system in cardiac sarcolemma by ouabain:
involvement of sodium and potassium.
N.-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Spt.16-18th
Lübeck-Travemünde 1980

(18) KYTE,J., 1975
Structural studies of sodium and potassium
ion-activated Adenosine Trphosphatase.
J. Biol. Chem. 250, 7443-7449

(19) LEVITSKY,D.O., ALIEV,M.K., KUZMIN,A.V., LEV-
CHENKO,T.S., SMIRNOW,V.N., and CHAZOV,E.J., 1976
Isolation of calcium pump system and purification
of calcium-ion dependent ATPase from Heart muscle.
Biochim. et Biophys. Acta 443, 468-484

(20) LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., and RANDALE,R.J., 1951
Protein measurement with Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

(21) MacINTYRE,J.D., GREEN,J.D., 1979
Stimulation of calcium transport in inside-out vesicles of human erythrocyte membranes by a soluble activator.
Biochim. et Biophys. Acta 510, 373-377

(22) MacLENNAN,D.H., HOLLAND,P.G., 1975
Calcium transport in sarcoplasmatic reticulum
Ann. Rev. of Biophys. and Bioeng. 4, 377-404

(23) MISSELWITZ,H.J., WILL,H., SCHULZE,W., WILLSHANAB,L. and WOLLENBERGER,A., 1979
Mass isolation of cell surface membrane fragments from pigeon heart.
Biochim. et Biophys. Acta 553, 197-212

(24) MIYAMATO,H., and RACKER,E., 1980
Solubilisation and partial purification of the Ca,Na Antiporter from the plasma membrane of bovine heart.
J. Biol. Chem. 255, No. 7, 2956-2958

(25) MAS-OLIVA,J., WILLIAMS,A.J., Nayler,W.G., 1979
ATP induced stimulation of calcium binding in cardiac sarcolemma.
Biochim. et Biophys. Res. Comm. 87, 441-447

(26) MAS-OLIVA,J., WILLIAMS,A.J., NAYLER,W.G., 1979
[illegible] of isolated cardiac sarcolemma into inside-out and right-side-out vesicles by affinity chromatography.
Biochem. Society Transactions 7, 950-952

(27) MORCOS,N.C., and DRUMMOND,G.J., 19[illegible]
Ca+Mg-ATPase in enriched sarcolemma from dog heart.
Biochim. et Biophys. Acta [illegible]

(28) NAYLER,W.G., DUNNET,J., and SULLIVAN,A., 1976
Drug induced change in the superficially located stores of calcium in heart sarcolemma.
University Park Press, Vol. 9, 53-70

(29) NAYLER,W.G., and NOACK,E., 1981
Influence of cardiac glycosides on electrolyte exchange and content in cardiac muscle cells.
Card. Glycos. T.I Hefter Heubners Hdb. der Pharmakologie 56 I, pp. 407-436

(30) NIGGLI,V., ROMMER,P., CARAFOLI,E., and PENNISTON,J.T., 1979
Effects of calmodulin on the Ca+Mg-ATPase partielly purified from erythrocyte membranes.
Arch. of Bioch. and Biophys. Vol. 192, 124-130

(31) NIGGLI,V., PENNISTON,J.T., CARAFOLI,E., 1979
Purification of the Ca+Mg-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column.
J. Biol. Chem. Vol. 254, 9955-9958

(32) NOACK,E.A., 1973
Der Einfluß von Beta-Rezeptorenblockern auf die Funktion isolierter Mitochondrien als mögliche Ursache ihrer cardiodepressiven Wirkung.
Habilitationsschrift, Düsseldorf

(33) NOACK,E.A., and GREEFF,K., 1975
Calcium uptake and storage in isolated heart mitochondria influenced by sodium and potassium ions.
University Park Press Baltimore Vol. 5, 165-170

(34) NOACK,E., KURZMACK,M., VERJOVSKI-ALMEIDA,S., and INESI,G., 1978
The effects of propranolol and its analogs on Ca^{2+}-transport by sarcoplasmatic reticulum vesicles.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 206, 281-288

(35) NOACK,E.A., HEINEN,E., and GREEFF,K., 1978
Correlation between the cellular electrolyte in atria with special regard to particular extracelluar space volume.
Life Science 22, 685-694

(36) PITTS,B.J., and OKHUYSEN,C.H., 1980
Sodium-calcium exchange and sodium pump activities in cardiac sarcolemma vesicles. Estimation of sideness.
Ann. of the New York Academy of Science Vol. 358, 257-278

(37) RAGNOTTI,G., LAWFORD,G.R., and CAMPBELL,P.N., 1969
Biosynthesis of microsomal nicotineamid-adenine dinucleotide phosphate-cytochrom-c reductase by membrane bound and free polysomes from rat liver.
Bioch. J. 112, 139-147

(38) ROUFOGALIS,B.D., 1973
Properties of a Ca,Mg-dependent ATPase of bovine brain cortex. Effects of detergents, freezing,cations,and local anesthetics.
Biochim. et Biophys. Acta 311, 360-370

(39) SACCOMANI,G., SPENNY,J.G., UHRY,D.W., ··
SACHS,G., 1974
Preparation of [illegible]
membrane of cardiac tissue.
J. of Mol. and Cell. Cardiol. 6, 505-521

(40) SCHAPIRA,G., DBOCZ,J., PIAN,J.P., and
DELAIN,E., 1974
An improved technique for preparation of
skeletle muscle cell plasma membrane.
Biochim. et Biophys. Acta 145, 348-358

(41) SPITZER,E., GROSSE,R., KUPRIJANOV,V., and
PREOBRAZHENSKY,A., 1981
Demonstration of a digitalis-sensitive sarco-
lemmal Ca-pump functionally coupled with a mem-
brane associated creatine phosphokinase.
Acta biol. med. germ. Band 40, S. 1111-1122

(42) SKOU,J.C., 1976
Coupling between ATP-hydrolysis and Sodium and
Potassium transport. Proceedings of a meeting
held on Sept. 6th-9th, 1976 in Grignon.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

(43) ST. LOUIS,P.J., SULAKHE,P.V., 1976
Protein Analysis of cardiac sarcolemma:
Effects of membrane-perturbing agents on
membrane proteins and calcium transport.
Biochem. 17, 4540-4550

(44) ST. LOUIS,P.J., SULAKHE,P.V., 1976
Isolation of sarcolemmal membranes from
cardiac muscle.
Int. J. Biochem. 7, 547-558

(45) ST. LOUIS,P.J., SULAKHE,P.V., DRUMMOND,G.J., and NG,D.G., 1972
Calcium binding by skeletal muscle sarcolemma.
J. Biol. Bioch. 248, No. 12, 4150-4157

(46) SULAKHE,P.V., ST. LOUIS,P.J., NARAYANNAN,N., WEI,J.W., 1978
Biochemical Characterisation of heart sarcolemma.
J. Mol. Cardiol. 8, 78

(47) TADA,M., KIRCHBERGER,M.A., and KATZ,A.M., 1975
Phosphorylation of a 22.000-Dalton Component of cardiac tissue SR by adenosine 3'5'-monophosphat-dependent proteinkinase.
J. Biol. Chem. Vol. 250, 2640-2647

(48) VERJOVSKI-ALMEIDA,S., and INESI,G., 1978
Fast kinetic evidence for an activating effect on the Ca^{2+}-transport of Sarcoplasmatic Retikulum ATPase.
J. of Biol. Chem. Vol. 254, 18-21

(49) WALSH,M.P., LE PENCH,C.J., VALLET,B., CAVADORE,J.C., and DEMAILLE,J.G., 1980
Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction.
J. of Mol. and Cell. Cardiol. 12, 1091-1101

(50) WOLF,H.U., DIECKVOSS,C., and LICHTNER,R., 1977
Purification and properties of high affinity Ca^{2+}-ATPase of human erythrocyte membranes.
Acta biol. med. germ. Band 36, S. 847-853

(51) WEBER,K., and OSBORN,M., 1969
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electroph.
J. Biol. Chem. 244, [illegible]

(52) WOLLENBERGER,A., SCHULZE,W., 1970
Cytochemical studies on sarcolemma: Na^+,K^+-ATPase and Adenylate Cyclase.
University Park Press Vol. 5,

(53) YAMAMOTO,S., FOX,A.L., and GREEFF,K., 1981
Inotropic effets and Na^+,K^+-ATPase inhibition of ouabain in isolated guinea pig atria and diaphragm.
Europ. J. of Pharmacology 71, 437-446

Herrn Prof. Dr. E. Noack gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Frl. I. Beyer und Herrn G. Steinbach danke ich für die technische Mitarbeit.

LEBENSLAUF

Am 1.5.1953 wurde ich als Sohn des Lehrers Richard Srugies und seiner Ehefrau Olga, geb. Wilk in Ratingen geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Lintorf trat ich im Herbst 1962 in das Leibniz-Gymnasium in Düsseldorf ein, an dem ich 1971 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich mein Studium im Fach Biologie an der Universität Köln. Dort bestand ich im Jahre 1975 die Diplomvorprüfung.

Anschließend daran erhielt ich zum Wintersemester 1976/77 einen Studienplatz an der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf. Im weiteren Verlauf meines Studiums begann ich im April 1980 bei Prof. Dr. E. Noack am Pharmakologischen Institut mit der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit.

Das Studium der Medizin schloß ich zum Ende des Wintersemesters 1982/83 ab, nachdem ich im November 1982 das Staatsexamen bestanden hatte.

Ratingen, den 27.4.83 Siegbert Srugies